

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

BÖSL, Raphael  
 Bardehle, Pagenberg, Dost,  
 Altenburg, Geissler, Isenbruck  
 Galileiplatz 1  
 81679 München  
 ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 25 March 2002 (25.03.02)
Applicant's or agent's file reference C29448PCT BÖ/ek
International application No. PCT/EP00/08996

**IMPORTANT NOTIFICATION**  
 International filing date (day/month/year)  
 14 September 2000 (14.09.00)

1. The following indications appeared on record concerning: <input checked="" type="checkbox"/> the applicant <input type="checkbox"/> the inventor <input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative				
Name and Address  CARDIOGENE GENTHERAPEUTISCHE SYSTEME AG Max-Planck-Strasse 15a 40699 Erkrath Germany	State of Nationality DE		State of Residence DE	
	Telephone No.			
	Facsimile No.			
	Teleprinter No.			
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning: <input type="checkbox"/> the person <input checked="" type="checkbox"/> the name <input type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence				
Name and Address  CARDION AG Max-Planck-Strasse 15a 40699 Erkrath Germany	State of Nationality DE		State of Residence DE	
	Telephone No.			
	Facsimile No.			
	Teleprinter No.			
3. Further observations, if necessary:				
4. A copy of this notification has been sent to: <input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office <input type="checkbox"/> the designated Offices concerned <input type="checkbox"/> the International Searching Authority <input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned <input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority <input type="checkbox"/> other:				

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer  Dorothée MÜLHAUSEN  Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION  
(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
US Department of Commerce  
United States Patent and Trademark  
Office, PCT  
2011 South Clark Place Room  
CP2/5C24  
Arlington, VA 22202  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)
15 May 2001 (15.05.01)

International application No.	Applicant's or agent's file reference
PCT/EP00/08996	C29448PCT BÖ/ek
International filing date (day/month/year)	Priority date (day/month/year)
14 September 2000 (14.09.00)	15 September 1999 (15.09.99)

Applicant
SCHLETER, Jens

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
19 February 2001 (19.02.01)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:  
\_\_\_\_\_

2. The election  was  
 was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Juan Cruz Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---



10

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM  
GEBIET DES PATENTWESES**

**PCT**

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT**

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>C29448PCT BÖ/ek</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b>	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/EP00/08996</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>14/09/2000</b>	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) <b>15/09/1999</b>
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK <b>A61K47/00</b>		
Anmelder <i>Alis (CARDIONAG) et al.</i> <i>CARDIOGENE GENTHERAPEUTISCHE SYSTEME AG</i>		

<p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 9 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt 9 Blätter.</p>
<p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Berichts</li> <li>II <input type="checkbox"/> Priorität</li> <li>III <input type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit</li> <li>IV <input checked="" type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung</li> <li>V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderlichen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung</li> <li>VI <input type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen</li> <li>VII <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung</li> <li>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung</li> </ul>

Datum der Einreichung des Antrags <b>19/02/2001</b>	Datum der Fertigstellung dieses Berichts <b>07.02.2002</b>
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   <b>Europäisches Patentamt - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016</b>	Bevollmächtigter Bediensteter  <b>Boulois, D</b> Tel. Nr. +31 70 340 3878



INTERNATIONALER VORLAUFIGER  
PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08996

**I. Grundlage des Berichts**

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17): Beschreibung, Seiten:*

1-40 ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-27 ursprüngliche Fassung

**Zeichnungen, Blätter:**

1/9-9/9 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:



INTERNATIONALER VORLÄUFIGER  
PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08996

Beschreibung, Seiten:  
 Ansprüche, Nr.:  
 Zeichnungen, Blatt:

5.  Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

**IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung**

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:

die Ansprüche eingeschränkt.  
 zusätzliche Gebühren entrichtet.  
 zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.  
 weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.

2.  Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.

3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3

erfüllt ist  
 aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:

4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:

alle Teile.  
 die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. beziehen.

**V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**



**INTERNATIONALER VON [REDACTED] AUFIGER  
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08996

**1. Feststellung**

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-24,26
	Nein: Ansprüche	25,27
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-24
	Nein: Ansprüche	25-27
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-27
	Nein: Ansprüche	

**2. Unterlagen und Erklärungen**  
**siehe Beiblatt**

**VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung**

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:  
**siehe Beiblatt**

**VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:  
**siehe Beiblatt**



Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

Der internationale vorläufige Prüfungsbericht betrifft die folgende Gegenstände:

- Ansprüche 1-24 : Pharmazeutische Zusammensetzung in Form eines Nukleinsäure-Lipid Komplexes
- Ansprüche 25-27: Verwendung einer isoosmotische Zusammensetzungen umfassend mindestens ein Mono- und/oder Disaccharid, und/oder mindestens einen mehrwertigen Alkohol und/oder mindestens ein anorganisches Salz zur Stabilisierung von Nukleinsäure-Lipid-Komplexen

Erster Gegenstand : Ansprüche 1-24

1. Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: Gene Ther. Protoc., (1997),127-133  
D2: US-A-5658565  
D3: WO-A-9620208 ( in der Anmeldung erwähnt )  
D4: Biochem. and Biophys. Res. Com., 179(1), 1991, 280-285  
  
D5: WO-A-9640964  
D6: WO-A-9634109  
D7: WO-A-9618732  
D8: Archives of Biochem. and Biophysics, 348, 1, 199-206, 1997  
D9: WO-A-9627393  
D10: WO-A-9640265  
D11: WO-A-9641873  
D12: WO-A-9640067

2. Die vorliegende Anmeldung erfüllt das in Artikeln 33(2) und 33(3) PCT genannte Kriterium, weil der Gegenstand der Ansprüche 1-24 im Hinblick auf den stand der Technik neu und erfinderisch ist.



2.1. Das Dokument D1 offenbart eine pharmazeutische Zusammensetzung in Form einer Nukleinsäure-Lipid-Komplexe enthaltend DC-Chol, ein nicht-kationisches Lipid ( siehe D1, Seiten 127-129 ), und eine Nukleinsäure kodierend für ein Protein zur Behandlung von Gefäßkrankheiten. Die Größe der Nukleinsäure-Lipid-Komplexe ist ungefähr 250 nm ( siehe D1, Seite 128, Z. 14 ).

2.2. Dokument D2 offenbart eine Liposomen-vermittelte Transfektion unter Verwendung einer iNOS DNA Sequenz. Die verwendete kationische Liposome enthalten DC-Chol, jedoch nicht in Verbindung mit einem nicht-kationischen Lipid ( siehe D2, Kol. 20. Z. 8-27 ). **Die Größe der Liposomen ist nicht angegeben.**

2.3. Zur Beurteilung der erfinderischen Tätigkeit können die Dokumenten D1 und D2 als besonders relevant angesehen.

~~Die zu lösende technische Aufgabe der vorliegenden Anmeldung ist eine Formulierung und ein Verfahren für einen nicht viralen Transfer von Nukleinsäuren in vaskuläre Zellen zu finden, die bzw. das einen effizienten in vivo Transfer des therapeutischen Gens in die Zielzellen unterstützt.~~

Ein wichtiger Faktor für diese Transfektionseffizienz ist die Größe der verwendeten Komplex, die von der DNA-Menge abhängig ist. Die einigen Daten die hierzu in D1 und D2 gefunden werden ( D1: 250 nm, D2: keine Größe angegeben ), sind außerhalb des Bereiches der für eine besonders effiziente Transfektion erforderlich ist ( 300-800 nm; siehe die Beschreibung der vorliegenden Anmeldung, Seite 28, Z. 11- Seite 29, Z. 9 und Seite 4, Z. 19-22 ). Die Verbesserung der Transfektionseffizienz durch die Auswahl einer bestimmtem Partikelgröße war aus D1 oder D2 nicht vorhersehbar. Folglich beruht die vorliegende Anmeldung auf einer erfinderischen Tätigkeit.

#### Zweiter Gegenstand : Ansprüche 25-27

1. Die vorliegende Anmeldung erfüllt das in Artikel 33(2) PCT genannte Kriterium nicht, weil der Gegenstand der Ansprüche 25 und 27 im Hinblick auf den stand der Technik nicht neu ist.

Ansprüche 25-27 betreffen nicht eine Erhöhung der Stabilität, sondern eine Stabilisierung von Nukleinsäure-Lipid in Lösung. Da es aus der vorliegenden



Ansprüche 25-27 unklar ist, was "Stabilisierung" bedeuten soll, muß dieser Begriff in einer breiten Weise interpretiert werden.

Die Verwendung eines Mono- und/oder Disaccharid und/oder einen mehrwertigen Alkohol und/oder ein anorganisches Salz zur Stabilisierung von Nukleinsäure enthaltenden kationischen Liposomen ist aus den folgenden Dokumenten bekannt:

- Dokument D5 ( siehe D5, Seiten 63,64,66,67 Beispiele 16 und 21): die Verwendung einer Salzlösung ist eindeutig offenbart in D5, dessen Beispiel 21 die Stabilisierung eines Komplexes beweist.
- Dokument D6 ( siehe D6, Seite 19, Beispiel 11 ): eine 0.9% NaCl Lösung ist isoosmotisch und wird in D6 als Stabilisierungsmittel verwendet. Mangel an der Neuheit der Ansprüche 25 und 27, die auf einer bekannten Stoffs gerichtet sind und sich von dem Stand der Technik lediglich durch die Angabe einer neu entdeckten technischen Wirkung unterscheiden, die dieser Verwendung zugrunde liegt, ergibt sich aus dem Gegenstand von D6.
- Dokument D7 ( siehe D7, Seite 48, Zeilen 14-18 )
- Dokument D12 ( siehe D12, Seite 20,22, Beispiele 5a,5b; Beispiele 6,7 ): Beispiel 5 offenbart eine gute Stabilisierung mit einer isosmotischen Salz- Mannitol- oder Dextroselösung ( Siehe Tab. 5; 300 MOsm Dextrose Lösung, 0.9% saline; Siehe Seite 24, Z. 7,8 ).

Deshalb ist der Gegenstand der Ansprüche 25 und 27 hinsichtlich D5,D6, D7 und D12 nicht neu ( Artikel 33(2) PCT ).

D8, D9, und D10 offenbaren die Verwendung eines Mono- und/oder Disaccharid und/oder einen mehrwertigen Alkohol und/oder ein anorganisches Salz zur Stabilisierung von Nukleinsäure enthaltenden kationischen Liposomen bei Lyophilisierung und/oder Rekonstituierung ( siehe D8, Seiten 203-205; siehe D9, Seite 11, Z. 15- S. 14, Z. 2 ; siehe D10, S. 10, Z. 6-19, S. 19-20, Ansprüche 1-3 ). Die verwendete Lösungen sind **nicht isoosmotisch**.

Deshalb ist der Gegenstand des Anspruchs 26 hinsichtlich D8,D9 und D10 neu ( Artikel 33(2) PCT ).

2. Die Dokumente D5,D6,D7,D8,D9,D10,D11 und D12 können bezüglich der erfinderischen Tätigkeit ( Artikel 33(3) PCT ) als besonders relevant angesehen



werden. Diese Dokumente lösen in der Tat die gleiche Aufgabe wie die vorliegende Anmeldung.

Es scheint besonders **logisch und unerfinderisch**, eine isoosmotische Lösung zu verwenden, um die Größe von Liposomepartikeln zu stabilisieren. Der Fachmann weiß, daß man eine isoosmotische Lösung verwenden muß, wenn man Liposomen **nicht schwollen oder schrumpfen** machen will.

Da alle beanspruchte Verbindungen schon bekannt sind als Stabilisatoren, kann eine Kombinierung von zwei oder mehrere Verbindungen als erfinderisch betrachtet werden, nur wenn die Kombinierung ein synergetisches Effekt liefert.

Daraus ergibt sich, soweit neue erfindungsgemäße Gegenstände betroffen sind, daß der Gegenstand der Ansprüche 25,26 und 27 offensichtlich nicht die Erforderungen des Artikels 33(3) PCT im Hinblick auf diese den Stand der Technik offenbarenden Dokumente erfüllt.

#### Zu Punkt VII

Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

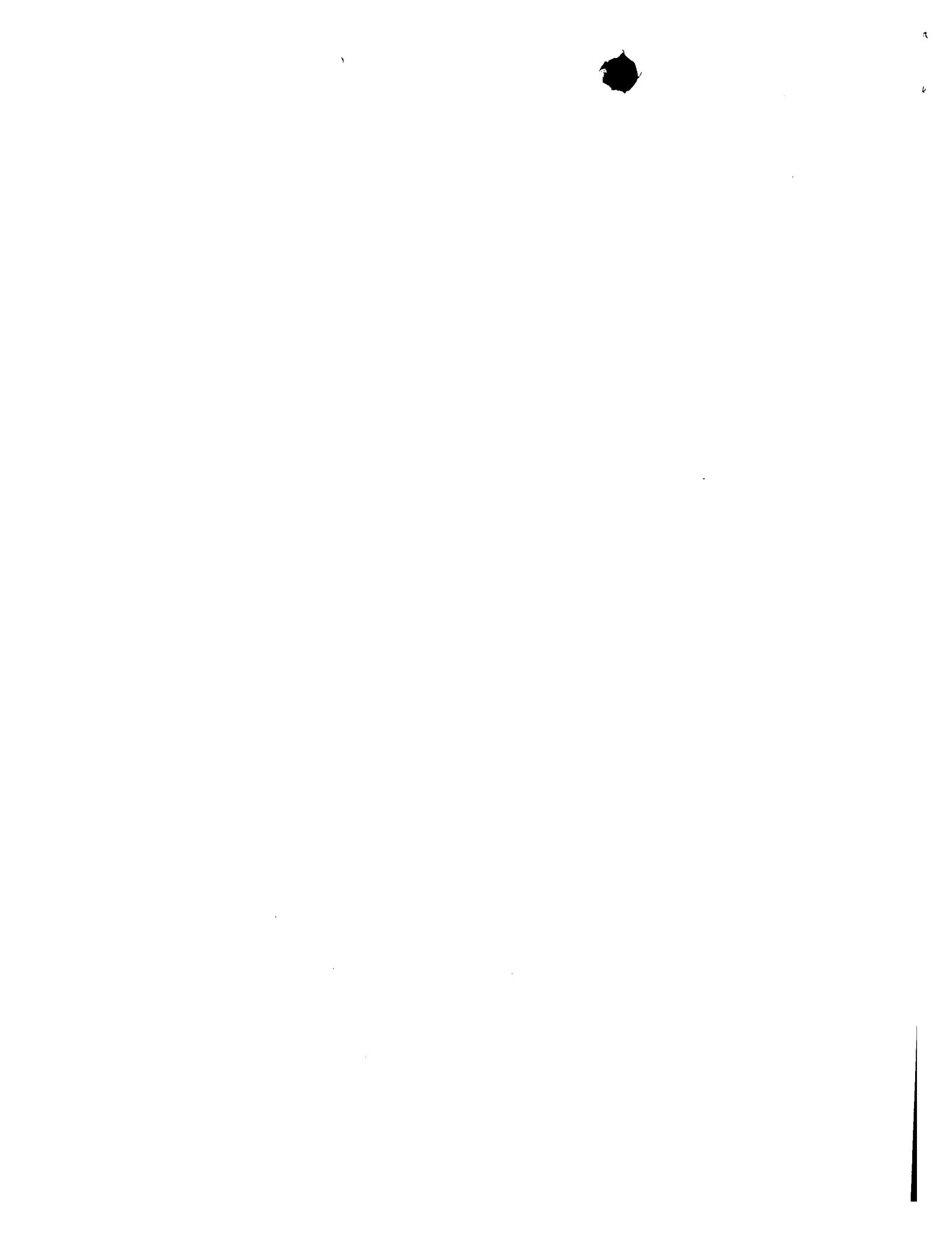
1. Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in den Dokumenten D1 und D2 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch diese Dokumente angegeben.

#### Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Aus der Beschreibung geht hervor, daß das Merkmal des Anspruchs 3 für die Definition der Erfindung wesentlich ist.

Eine Nukleinsäure ist nicht ausreichend charakterisiert durch seine Kodierungsprofil wie



"eine Nukleinsäure kodierend für ein Protein zur Behandlung von Gefäßkrankheiten". Diese Definition ist undeutlich und macht als solche den Umfang der Ansprüche unklar.

**Der Gegenstand der Ansprüche muß an sich klar sein.**

Da der unabhängige Anspruch 1 das Merkmal des Anspruchs 3 nicht enthält, entspricht er nicht dem Erfordernis des Artikels 6 PCT in Verbindung mit Regel 6.3 b) PCT, daß jeder unabhängige Anspruch alle technischen Merkmale enthalten muß, die für die Definition der Erfindung wesentlich sind.

2. Der in den Ansprüchen 1 und 2 benutzte Ausdruck "ca." ist vage und unklar und läßt den Leser über die Bedeutung der betreffenden wesentlichen technischen Merkmale im Ungewissen. Dies hat zur Folge, daß die Definition des Gegenstands dieser Ansprüche nicht klar ist (Artikel 6 PCT).



Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

6

Applicant's or agent's file reference C29448PCT BÖ/ek	FOR FURTHER ACTION	SeeNotificationofTransmittalofInternational Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/EP00/08996	International filing date (day/month/year) 14 September 2000 (14.09.00)	Priority date (day/month/year) 15 September 1999 (15.09.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 47/00		
Applicant	CARDION AG	

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>9</u> sheets, including this cover sheet.
<input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:  I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input checked="" type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 19 February 2001 (19.02.01)	Date of completion of this report 07 February 2002 (07.02.2002)
Name and mailing address of the IPEA/EP  Facsimile No.	Authorized officer  Telephone No.



## I. Basis of the report

## 1. With regard to the elements of the international application:\*

 the international application as originally filed the description:

pages 1-40, as originally filed

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

 the claims:

pages 1-27, as originally filed

pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

 the drawings:

pages 1/9-9/9, as originally filed

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

 the sequence listing part of the description:

pages \_\_\_\_\_, as originally filed

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

## 2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

 the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)). the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)). the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

## 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

 contained in the international application in written form. filed together with the international application in computer readable form. furnished subsequently to this Authority in written form. furnished subsequently to this Authority in computer readable form. The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished. The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4.  The amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages \_\_\_\_\_ the claims, Nos. \_\_\_\_\_ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_5.  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



**IV. Lack of unity of invention**

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- restricted the claims.
- paid additional fees.
- paid additional fees under protest.
- neither restricted nor paid additional fees.

2.  This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- complied with.
- not complied with for the following reasons:

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- all parts.
- the parts relating to claims Nos. \_\_\_\_\_



**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-24, 26	YES
	Claims	25, 27	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-24	YES
	Claims	25-27	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-27	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The international preliminary examination report pertains to the following subjects:

- Claims 1-24: pharmaceutical composition in the form of a nucleic acid-lipid complex
- Claims 25-27: use of an isoosmotic composition comprising at least a mono- and/or a disaccharide and/or at least a polyhydric alcohol and/or at least an inorganic salt to stabilize nucleic acid-lipid complexes.

First subject: Claims 1-24

1. The following documents are referred to:

D1: Gene Ther. Protoc., (1997) 127-133

D2: US-A-5 658 565

D3: WO-A-96/20208 ((mentioned in the application)

D4: Biochem. and Biophys. Res. Com., 179(1), 1991, 280-285

D5: WO-A-96/40964

D6: WO-A-96/34109

D7: WO-A-96/18732

D8: Archives of Biochem. and Biophysics, 348, 1, 199-206, 1997

D9: WO-A-96/27393



D10: WO-A-96/40265

D11: WO-A-96/41873

D12: WO-A-96/40067

2. The present application meets the criterion stipulated in PCT Article 33(2) and (3) because the subject matter of Claims 1-24 is novel and involves an inventive step with respect to the prior art.

2.1 D1 discloses a pharmaceutical composition in the form of a nucleic acid-lipid complex comprising DC-chol, a non-cationic lipid (see D1, pages 127-129) and a nucleic acid encoding a protein for treating vascular disease. The size of the nucleic acid-lipid complex is about 250 nm (see D1, page 128, line 14).

2.2 D2 discloses liposome-mediated transfection using an iNOS DNA sequence. The cationic liposomes used contain DC-chol, but not in combination with a non-cationic lipid (see D2, column 20, lines 8-27). **The size of the liposomes is not indicated.**

2.3 In the assessment of inventive step, D1 and D2 may be considered especially relevant.

The problem addressed by the present application consists in providing a formulation and a process for non-viral nucleic acid transfer into vascular cells which support efficient in vivo transfer of the therapeutic gene into the target cells.

The size of the complex used, which depends on the amount of DNA, is an important factor in the efficiency of transfection. The only relevant data shown in D1 and D2 (D1: 250 nm, D2: size not indicated) are outside the range



required for especially efficient transfection (300-800 nm: see the description in the present application, page 28, line 11 - page 29, line 9 and page 4, lines 19-22). More efficient transfection owing to the selection of a particular particle size could not have been anticipated in light of D1 or D2.

Consequently, the present application involves an inventive step.

Second subject: Claims 25-27

1. The present application does not meet the criterion stipulated in PCT Article 33(2) because the subject matter of Claims 25 and 27 is not novel over the prior art.

Claims 25-27 pertain not to improved stability, but to stabilization of nucleic acid-lipid complexes in solution. Since the meaning of "stabilization" is unclear from Claims 25-27, this term must be broadly interpreted.

The following documents disclose the use of a mono- and/or a disaccharide and/or a polyhydric alcohol and/or an inorganic salt to stabilize nucleic acid-containing cationic liposomes:

- D5 (see D5, pages 63, 64, 66 and 67 and Examples 16 and 21): the use of a saline solution is clearly disclosed in D5, Example 21 of which demonstrates the stabilization of a complex;
- D6 (see D6, page 19, Example 11): a 0.9% NaCl solution is isoosmotic and is used in D6 as a stabilizing agent. Since Claims 25 and 27 are directed at a known substance and differ from the prior art only in indicating a newly-discovered technical effect



underlying this use, the subject matter of D6 is prejudicial to the novelty of said claims;

- D7 (see D7, page 48, lines 14-18);
- D12 (see D12, pages 20 and 22, Examples 5a and 5b, and Examples 6 and 7): Example 5 discloses that good stabilization is achieved using a solution of salt, mannitol or dextrose (see Table 5: 300 mOsm dextrose solution, 0.9% saline; see page 24, lines 7-8).

Consequently, the subject matter of Claims 25 and 27 is not novel over D5-D7 and D12 (PCT Article 33(2)).

D8-D10 disclose the use of a mono- and/or a disaccharide and/or a polyhydric alcohol and/or an inorganic salt to stabilize nucleic acid-containing cationic liposomes during lyophilization and/or reconstitution (see D8, pages 203-205; see D9, page 11, line 15 - page 14, line 2; see D10, page 10, lines 6-19, pages 19-20 and Claims 1-3). The solutions used are **not isoosmotic**.

Consequently, the subject matter of Claim 26 is novel over D8-D10 (PCT Article 33(2)).

2. D5-D12 may be considered especially relevant with respect to inventive step (PCT Article 33(3)). These documents actually solve the same problem as that addressed by the present application.

Use of an isoosmotic solution to stabilize the size of liposome particles appears particularly logical and uninventive. A person skilled in the art knows that an isoosmotic solution must be used **to prevent liposomes from swelling or shrinking**.



Since all the claimed compounds are known stabilizers, a combination of two or a plurality of compounds may be considered inventive only if the combination yields a synergistic effect.

In light of these prior art documents, it follows that the subject matter of Claims 25-27, insofar as it is novel, apparently does not meet the requirements of PCT Article 33(3).



**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.  
PCT/EP 00/08996

**VII. Certain defects in the international application**

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

1. Contrary to PCT Rule 5.1(a) (ii), the description does not cite D1-D2 or indicate the relevant prior art disclosed therein.



## VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

It follows from the description that the feature of Claim 3 is essential to defining the invention.

A nucleic acid is not sufficiently characterized by its categorization as, for example, "a nucleic acid encoding a protein for treating vascular disease". This definition is unclear and, as such, makes the scope of the claims unclear. **The subject matter of the claims must be clear per se.**

Since independent Claim 1 does not contain the feature of Claim 3, it does not meet the requirement of PCT Article 6 in conjunction with PCT Rule 6.3(b) that each independent claim must contain all those technical features which are necessary for the definition of the invention.

2. The term "ca." used in Claims 1 and 2 is vague and unclear and leaves the reader uncertain as to the meaning of the relevant necessary technical features. Consequently, the definition of the subject matter of these claims is unclear (PCT Article 6).



(12) NACH DEM VERTRAG FÜR DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
22. März 2001 (22.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 01/19400 A2

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: A61K 47/00

(74) Anwalt: BÖSL, Raphael; Bardehle, Pagenberg, Dost, Altenburg, Geissler, Isenbruck, Galileiplatz 1, 81679 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/08996

(81) Bestimmungsstaaten (national): AU, CA, CN, CZ, HU, ID, IL, IN, JP, KR, NO, PL, RU, SG, SI, SK, TR, US, ZA.

(22) Internationales Anmeldedatum: 14. September 2000 (14.09.2000)

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

**Veröffentlicht:**

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(30) Angaben zur Priorität:  
199 44 262.2 15. September 1999 (15.09.1999) DE

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): CARDIOGENE GENTHERAPEUTISCHE SYSTEME AG [DE/DE]; Max-Planck-Strasse 15a, 40699 Erkrath (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHLETTNER, Jens [DE/DE]; Lortzingstrasse 27, 40742 Hilden (DE).

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION IN THE FORM OF A NUCLEIC ACID LIPID COMPLEX, THE PRODUCTION THEREOF AND ITS USE IN GENE THERAPY

(54) Bezeichnung: PHARMAZEUTISCHE ZUSAMMENSETZUNG IN FORM EINES NUKLEINSÄURE-LIPID-KOMPLEXES, IHRE HERSTELLUNG UND VERWENDUNG IN DER GENTHERAPIE

(57) Abstract: The invention relates to a pharmaceutical composition in the form of a nucleic acid lipid complex containing at least one cationic lipid, at least one non-cationic lipid, at least one nucleic acid that codes for a protein used for treating vascular diseases, especially a protein having vasodilatory and/or angiogenic properties, and optionally containing appropriate auxiliary and/or addition agents. According to the invention, the cationic lipid (KL) contains a group derived from cholesterol on which at least one cationic amino group selected from a primary, secondary, tertiary amino group and/or from a quaternary ammonium salt is bound via a connecting group selected from carboxamides and carbamoyls, and via a spacer comprised of a linear or branched alkyl group with 1 to 20 carbon atoms. In addition, the size of the nucleic acid lipid complexes ranges from approximately 300 to 800 nm. The invention also relates to the production of the pharmaceutical composition and to its use in gene therapy.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine pharmazeutische Zusammensetzung in Form eines Nukleinsäure-Lipid-Komplexes enthaltend mindestens ein kationisches Lipid, mindestens ein nicht-kationisches Lipid, mindestens eine Nukleinsäure kodierend für ein Protein zur Behandlung von Gefäßkrankheiten, insbesondere ein Protein mit gefäßweiternden und/oder gefäßbildenden Eigenschaften, und gegebenenfalls geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe, wobei das kationische Lipid (KL) eine von Cholesterin abgeleitete Gruppe enthält, an der über eine Verbindungsgruppe, ausgewählt aus Carboxamiden und Carbamoylen, und einen Spacer, bestehend aus einer linearen oder verzweigten Alkylgruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen, mindestens eine kationische Aminogruppe, ausgewählt aus primärer, sekundärer, tertiärer Aminogruppe und/oder einem quartären Ammoniumsalz, gebunden ist, und wobei die Größe der Nukleinsäure-Lipid-Komplexe in einem Bereich von ca. 300-800 nm liegt. Weiterhin betrifft die Erfindung die Herstellung der pharmazeutischen Zusammensetzung und ihre Verwendung in der Gentherapie.

WO 01/19400 A2



5

**Pharmazeutische Zusammensetzung in Form eines Nukleinsäure-Lipid-Komplexes, ihre Herstellung und Verwendung in der Gentherapie**

10 Die vorliegende Erfindung betrifft eine pharmazeutische Zusammensetzung in Form eines Nukleinsäure-Lipid-Komplexes enthaltend mindestens ein kationisches Lipid, mindestens ein nicht-kationisches Lipid, mindestens eine Nukleinsäure kodierend für ein Protein zur Behandlung von Gefäßkrankheiten, insbesondere ein Protein mit gefäßerweiternden und/oder gefäßbildenden 15 Eigenschaften, und gegebenenfalls geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe, wobei das kationische Lipid (KL) eine von Cholesterin abgeleitete Gruppe enthält, an der über eine Verbindungsgruppe, ausgewählt aus Carboxamiden und Carbamoylen, und einen Spacer bestehend aus einer linearen oder verzweigten Alkylgruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen mindestens eine kationische 20 Aminogruppe, ausgewählt aus primärer, sekundärer, tertiärer Aminogruppe und/oder einem quartären Ammoniumsalz, gebunden ist, und wobei die Größe der Nukleinsäure-Lipid-Komplexe in einem Bereich von ca. 300-800 nm liegt. Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung die Herstellung der pharmazeutischen Zusammensetzung und ihre Verwendung in der Gentherapie.

25

Es sind bereits eine Reihe von pharmazeutischen Zusammensetzungen in Form eines Nukleinsäure-Lipid-Komplexes entwickelt worden, die ein kationisches Lipid und eine Nukleinsäure sowie gegebenenfalls weitere Hilfs- und/oder Zusatzstoffe enthalten.

30

Reszka (WO 96/20208 und DE 196 23 916) entwickelte das kationische Cholesterinderivat  $3\beta$ -[N-(N,N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyl]cholesterin

(DAC-Chol) und beschrieb seine Verwendung für den direkten liposomalen Gentransfer *in vivo*. Bei der Herstellung der beschriebenen Liposomen wurde DAC-Chol mit Dioleylphosphatidylethanolamin (DOPE) als Helferlipid in einem molaren Verhältnis von 3:2 verwendet. Epand, R.M. et al. (US 5,283,185) beschrieben ein Verfahren zur Übertragung von Nukleinsäuren in Zellen unter Verwendung von kationischen Lipiden mit Proteinkinase C-inhibitorischen Eigenschaften, insbesondere des kationischen Lipids 3 $\beta$ -[N-(N',N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyl]-cholesterin (DC-Chol), und einem Co-Lipid wie DOPE. Ein Säureadditionssalz von DC-Chol und seine Verwendung zur Transfektion von tierischen Zellen mittels eines liposomalen Systems wurde ebenfalls beschrieben (US 5,753,262). Des weiteren wurden amphipatische Vehikel, die Polyamin-Cholesterin-Konjugate umfassen, für die Übertragung von Nukleinsäuren in Zellen, z.B. bei der Gentherapie, vorgeschlagen (US 5,614,503). Eine liposomale Zusammensetzung für die Übertragung eines DNA-Moleküls, die ein kationisches Lipid zusammen mit einem neutralen Co-Lipid umfaßt, wurde beschrieben, bei der die Liposomen eine Größe von ca. 800 nm besitzen (WO 98/17814). Komplexe aus Nukleinsäure und kationischen Liposomen wurden auch zur Erzielung einer organspezifischen Genexpression bei einem Säugetier vorgeschlagen (US 5,676,954). Szoka, F.C. et al. (US 5,811,406) entwickelten ein Transfektionsverfahren unter Verwendung eines Lipid-Polynukleotid-Komplexes, der durch Zugabe einer kryoprotektiven Verbindung stabilisiert wurde und anschließend lyophilisiert wurde. Die lyophilisierten Komplexe wurden direkt ohne Rekonstituierung zur Transfektion eingesetzt. Sorgi, F.L. und Huang, L. (WO 96/27393) beschrieben eine Trockenpulver-Formulierung, die einen lyophilisierten Nukleinsäure-Liposomen-Komplex enthielt. Der lyophilisierte Komplex kann nach Rekonstituierung als ein Aerosol zur Genübertragung *in vitro* und *in vivo* eingesetzt werden. Insbesondere wurden DC-Chol und DOPE als Lipide, wahlweise mit einem Zucker als kryoprotektiver Verbindung, eingesetzt. Bischoff, R. (WO 98/08489) beschrieb Lipid-Nukleinsäure-Komplexe, die ein kationisches Lipid (z.B. DC-Chol), ein Co-Lipid (z.B. DOPE), einen stabilisierenden Zusatzstoff (PEG und Derivate davon) und eine Nukleinsäure

enthielten. Die entstehenden Partikel besaßen eine Größe von 500 nm oder weniger. Des weiteren schlugen Marshall, J. et al. (WO 98/13026) eine Zusammensetzung vor, die ein kationisches amphiphiles Molekül, ein Nukleinsäuremolekül und vorzugsweise ein Co-Lipid, umfaßt. Schließlich 5 beschrieben Debs, R.J. und Zhu, N. (US 5,827,703) einen liposomalen Komplex zur systemischen Einführung von Erbmaterial in ein Säugetier, wobei der Komplex ein kationisches Lipid in Verbindung mit Cholesterin als nicht-kationischem Lipid umfaßt.

10 Ein Beispiel für die Herstellung von DNA-Liposomen-Komplexen aus Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin und Cholesterin und deren erfolgreiche Anwendung in der Transfektion von Gefäßwänden mit Hilfe von Sendai-Viren wurde in der DE 44 11 402 beschrieben. Ein Transfektionssystem enthaltend einen Infiltrator-Katheter, eine Nukleinsäure in Form eines Nukleinsäure-15 Liposomen-Komplexes, und ggf. geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe und dessen Verwendung zur Behandlung von Gefäßerkrankungen sind aus der DE 197 29 769 bekannt.

Es ist anhand der vorgenannten Dokumente leicht ersichtlich, daß zahlreiche 20 Bemühungen unternommen wurden, um ein möglichst geeignetes Transfektionssystem zur Verwendung in der Gentherapie bereitzustellen. Dies gilt insbesondere auch für die gentherapeutische Behandlung von Gefäßkrankheiten, wie Bluthochdruck, Arteriosklerose, Stenose oder Restenose.

25 Aufgabe der Arbeiten zur vorliegenden Erfindung war es, eine Formulierung und ein Verfahren für den nicht-viralen Transfer von Nukleinsäuren in vaskuläre Zellen zu finden, das einen effizienten Transfer des therapeutischen Gens in die Zielzellen unterstützt, eine lokale Anreicherung eines therapeutischen Proteins in der Gefäßwand bei größtmöglicher Schonung des umgebenden Gewebes 30 bewerkstelligt und die kommerzielle Herstellung eines Lyophilisats in einer für den Vertrieb geeigneten Form ermöglicht.

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß man therapeutische liposomale Formulierungen mit sehr hoher Effizienz lokal in Zellen der Gefäßwand transferieren kann, wenn man Nukleinsäuren mit geeigneten Lipiden und geeigneten Zusatz- und/oder Hilfsstoffen zu Komplexen einer definierten Größe 5 formuliert und diese Komplexe in die Zielzellen der Gefäßwand einbringt.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher eine pharmazeutische Zusammensetzung in Form eines Nukleinsäure-Lipidkomplexes, enthaltend mindestens ein kationisches Lipid, mindestens ein nicht-kationisches Lipid, eine 10 Nukleinsäure, kodierend für ein Protein zur Behandlung von Gefäßkrankheiten, insbesondere ein Protein mit gefäßerweiternden und/oder gefäßbildenden Eigenschaften und ggf. weitere Hilfs- und/oder Zusatzstoffe, wobei das kationische Lipid (KL) eine von Cholesterin abgeleitete, insbesondere lipophile, Gruppe enthält, an der über eine Verbindungsgruppe, ausgewählt aus 15 Carboxamiden und Carbamoylen, und einen Spacer, bestehend aus einer linearen oder verzweigten Alkylgruppe mit 1 bis 20, vorzugsweise 1 bis 10, Kohlenstoffatomen, mindestens eine kationische Aminogruppe, ausgewählt aus primärer, sekundärer, tertiärer Aminogruppe und/oder einem quartären Ammoniumsalz, gebunden ist, und wobei die Größe der Nukleinsäure-Lipid- 20 Komplexe in einem Bereich von ca. 300-800 nm liegt. Besonders gute Ergebnisse lassen sich erzielen, wenn man Nukleinsäure-Lipid-Komplexe mit einer Größe von ca. 350-550 nm für den Gentransfer, insbesondere *in vivo*, einsetzt.

Bei den Nukleinsäure-Lipid-Komplexen handelt es sich üblicherweise um 25 liposomale Komplexe. Im allgemeinen enthalten diese liposomalen Komplexe, insbesondere die Nukleinsäuren, keine viralen Bestandteile. Bei der Nukleinsäure handelt es sich üblicherweise um genomische DNA, cDNA, synthetische DNA, RNA, mRNA, Ribozyme, Antisense-RNA, synthetische Peptidnukleinsäuren und Oligonukleotide, vorzugsweise um eine cDNA. Die Nukleinsäure kann zum 30 Beispiel in Form eines geeigneten DNA-Expressionsvektors verwendet werden (siehe z.B. DE 44 11 402). Bei dem Protein oder Polypeptid, das zur Behandlung

von Gefäßkrankheiten eingesetzt wird, handelt es sich vorzugsweise um eines mit gefäßerweiternden und/oder gefäßbildenden Eigenschaften. Beispiele für Proteine mit gefäßerweiternden Eigenschaften sind die Isoformen der Stickoxidsynthase (NOS) und der Hämoxxygenase (HO), während die Isoformen des Monocyte Chemoattractant Protein (MCP) gefäßbildende Eigenschaften aufweisen. Die Familie der Stickoxidsynthasen umfaßt mindestens drei verschiedene Isoenzyme: Das endotheliale Enzym (eNOS), das neuronale Enzym (nNOS) und die induzierbare NOS (iNOS) (siehe z.B. DE 44 11 402 und DE 197 29 769). Die Familie der Hämoxxygenasen umfaßt ebenfalls mindestens drei Isoenzyme: Die Hämoxxygenase 1 (HO-1), die Hämoxxygenase 2 (HO-2), und die Hämoxxygenase 3 (HO-3) (siehe z.B. Soares, M.P. et al. (1998) Nature Medicine 4, 1073; Hancock, W.W. et al. (1998) Nature Medicine 4, 1392; Yoshida, T. et al. (1988) Eur. J. Biochem. 171, 457; McCoubrey, W.K. Jr et al. (1992) Arch. Biochem. Biophys. 295, 13; McCoubrey, W.K. Jr et al. (1997) Eur. J. Biochem. 247, 725). Zu den Isoformen des Monocyte Chemoattractant Protein gehören unter anderem die folgenden Proteine: MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4 und MCP-5 (siehe z.B. US 5,212,073; US 5,278,287; Ito, W.D. et al. (1997) Circ. Res. 80, 829; Arras, M. (1998) J. Clin. Invest. 101, 40; WO 97/35982 und WO 98/44953). Besonders bevorzugt ist eine Nukleinsäure, die für die induzierbare Stickoxidsynthase (iNOS), die Hämoxxygenase 1 (HO-1), das Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) oder eine Variante davon kodiert, wobei die jeweilige humane Form wiederum besonders bevorzugt ist.

Die iNOS besitzt neben ihrer gefäßerweiternden Wirkung eine antithrombotische und antiproliferative Wirkung. Entzündungsmediatoren wie Endotoxine führen zu der vermehrten Expression dieses Enzyms, das auch als induzierbare Stickoxidsynthase bezeichnet wird (siehe auch DE 44 11 402 und DE 197 29 769). Die Hämoxxygenase-Isoformen HO-1 und HO-2 werden unter anderem im Gefäßsystem exprimiert und bauen Häm zum Gallenfarbstoff Biliverdin ab. Dies geschieht unter Freisetzung von freiem Eisen und Kohlenmonoxid (CO). Letzteres übt, ähnlich wie das von der NOS erzeugte Stickoxid (NO), eine gefäßerweiternde

und antithrombotische Wirkung aus. Obwohl das durch die HO-1 gebildete CO ebenso wie NO die Proliferation glatter Muskelzellen hemmt, induziert HO-1 im Gegensatz zur NOS keinen apoptotischen Zelltod. Die HO-1 ist darüber hinaus in Transplantationsmodellen als entzündungshemmend und immunprotektiv 5 beschrieben worden (Hancock et al., *supra*; und Soares et al., *supra*). Die Isoform 1 des Monocyte Chemoattractant Protein (auch Monocyte Chemotactic Protein-1 oder JE-Cytokin genannt), MCP-1, ist bei der Arteriogenese, d.h. der Bildung von Kollateralgefäßen aus bereits vorhandenen Arteriolen, von Bedeutung. Durch Infusion des MCP-1-Proteins in künstlich induzierte Verschlußstellen der 10 Femoralarterie im Tiermodell Kaninchen (Ito et al., *supra*; Arras et al., *supra*) läßt sich die Bildung von Kollateralgefäßen erzielen, die den Blutfluß in die behandelten Extremitäten wiederherstellen.

Die vorliegende Erfindung umfaßt auch Varianten der vorgenannten Proteine. 15 Unter dem Begriff "Variante" werden hierin Proteine oder Polypeptide verstanden, die eine Sequenzhomologie, insbesondere eine Sequenzidentität von ca. 70%, vorzugsweise von ca. 80%, insbesondere von ca. 90%, vor allem von ca. 95% zu den vorgenannten Proteinen besitzen. Ferner zählen hierzu auch Deletionen des Proteins im Bereich von ca. 1-60, vorzugsweise von ca. 1-30, 20 insbesondere von ca. 1-15, vor allem von ca. 1-5 Aminosäuren. Daneben zählen hierzu auch Fusionsproteine, die die vorgenannten Proteine enthalten. Unter Varianten versteht man auch allelische Varianten, die von anderen Zellen bzw. Geweben abstammen. Auch versteht man darunter Proteine, die von verschiedenen Individuen stammen. Dementsprechend umfaßt die vorliegende 25 Erfindung auch Nukleinsäuren, die für die vorgenannten Proteine oder Polypeptide kodieren. Beispiele derartiger verwandter Nukleinsäuren sind Nukleinsäuren aus unterschiedlichen menschlichen Zellen bzw. Geweben oder allelische Varianten, sowie Nukleinsäuren, die von verschiedenen menschlichen Individuen stammen können. Im weiteren Sinne versteht man unter einer 30 „Variante“ einer Nukleinsäure gemäß der vorliegenden Erfindung eine Nukleinsäure, die eine Homologie, insbesondere eine Sequenzidentität von ca.

60%, vorzugsweise ca. 75%, insbesondere von ca. 90% und vor allem von ca. 95% aufweist. Dem Fachmann stehen geeignete Techniken und Verfahren zur Herstellung und Mutagenese von Nukleinsäuren sowie zur Genexpression und Proteinanalyse zur Verfügung (siehe z.B. Sambrook, J. et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Glover, D.M. (1995) DNA cloning: A practical approach, Volume II: Expression systems, IRL Press; Ausubel et al. (1992) Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons; Rees, A.R. et al. (1993) Protein Engineering: A practical approach, IRL Press). Unter dem Ausdruck „mindestens eine Nukleinsäure“ versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung, daß die Nukleinsäure-Lipid-Komplexe auch Kombinationen aus mehr als einer Nukleinsäure umfassen können, wobei die Nukleinsäuren sowohl für verschiedene Formen eines therapeutischen Proteins als auch für verschiedene der hierin beschriebenen therapeutischen Proteine kodieren können.

15 In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem kationischen Lipid um  $3\beta$ -[N(N'N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyl]cholesterin (siehe z.B. Epand et al., *supra*) oder  $3\beta$ -[N-(N,N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyl]cholesterin (DAC-Chol) (siehe z.B. Reszka, *supra*).

20 Bei dem mindestens einen nicht-kationischen Lipid handelt es sich üblicherweise um ein Lipid ausgewählt aus mindestens einem Phosphatidylcholin, mindestens einem Phosphatidylethanolamin und/oder Cholesterin. Vorzugsweise ist das Phosphatidylethanolamin ein Phosphatidylethanolamin mit einer Kettenlänge von 25 10-28 Kohlenstoffatomen, insbesondere Dimyristoylphosphatidylethanolamin (DMPE), Dipalmitoylphosphatidylethanolamin (DPPE) und/oder Dioleylphosphatidyl-ethanolamin (DOPE), wobei DOPE besonders bevorzugt ist.

30 Als besonders vorteilhaft stellte sich eine pharmazeutische Zusammensetzung heraus, bei der das kationische Lipid DAC-Chol ist und das nicht-kationische Lipid DOPE ist, vorzugsweise in einem Gewichtsverhältnis von DAC-Chol zu

DOPE von ca. 10:90 bis ca. 90:10, wobei hiermit alle Gewichtsverhältnisse, die zwischen diesen angegebenen Verhältnissen liegen, wie ca. 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30 und 80:20, insbesondere aber auch dazwischenliegende Verhältnisse, wie z.B. 21:79, 22:78, 23:77, 24:76, 25:75, 26:74, 27:73, 28:72, 5 29:71 und 31:69, 32:68, 33:67, 34:66, 35:65, 36:64, 37:63, 38:62 und 39:61, mitumfaßt sind. Besonders bevorzugt ist ein Gewichtsverhältnis vom DAC-Chol zu DOPE von ca. 30:70. Alternativ dazu kann das Verhältnis des kationischen Lipids zum nicht-kationischen Lipid auch als molares Verhältnis ausgedrückt werden.

10

Die erfindungsgemäße Zusammensetzung wird unter Einsatz von Gesamtlipid aus kationischem Lipid und ggf. nicht-kationischem Lipid zu Nukleinsäure im Verhältnis von ca. 1:1 bis ca. 10:1, jeweils bezogen auf das Gewicht, erhalten. Besonders vorteilhaft ist die Verwendung eines Gewichtsverhältnisses von ca. 4:1 15 bis ca. 5:1, bei dem sich *in vivo* eine überraschend gute Transfektionseffizienz ergibt.

Die erfindungsgemäße Zusammensetzung kann als Lösung, insbesondere als eine frisch hergestellte wäßrige Lösung, oder als Lyophilisat, das nach Rekonstituieren 20 eingesetzt werden kann, vorliegen.

Vorzugsweise enthält die erfindungsgemäße Zusammensetzung einen oder mehrere Hilfsstoffe. Besonders bevorzugt ist hierbei ein Mittel, das die Nukleinsäure-Lipid-Komplexe sowohl in unlyophilisierter, als auch lyophilisierter 25 Form stabilisiert. Als Maß für die Stabilität der Komplexe kann die zeitlich konstante Größe dieser Komplexe herangezogen werden. Vorteilhafterweise handelt es sich bei dem stabilisierenden Mittel um mindestens einen Zucker, mindestens ein anorganisches Salz und/oder mindestens einen mehrwertigen Alkohol. In einem weiteren Sinne versteht man hierin unter einem Zucker auch 30 einen Zuckeralkohol wie z.B. Mannit. Ein Beispiel für einen mehrwertigen Alkohol ist Polyethylenglykol (PEG). Die Kombination von Saccharose als

Zucker und NaCl als anorganisches Salz ist besonders bevorzugt. Das nachfolgend vorgeschlagene Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen sieht beispielsweise vor, diese Kombination von Stoffen mittels einer isoosmotischen Lösung in einem geeigneten Verfahrensschritt einzubringen. Dem Fachmann werden angesichts der vorliegenden Beschreibung weitere Möglichkeiten für die Aufnahme des stabilisierenden Mittels ersichtlich sein.

Die erfindungsgemäße Zusammensetzung kann weiterhin mindestens einen Zusatzstoff enthalten. Bevorzugterweise handelt es sich hierbei um mindestens ein spezifisch die Zielzellen erkennendes Molekül und/oder ein den Gentransfer in die Zellen erleichterndes Molekül. Das spezifische Erkennen von Zellen bezeichnet man auch als "Targeting". Für dieses Targeting stehen grundsätzlich mindestens zwei Möglichkeiten zur Verfügung: Zum einen kann man Antikörper gegen Strukturen an der Zelloberfläche wie z.B. Rezeptoren verwenden, die in virale oder liposomale Vektorsysteme integriert sind (Vingerhoeds, H. et al. (1994) Immunmeth 4, 259; Wickham, T.J. et al. (1996) J. Virol. 70, 6831), und zum anderen kann man Peptide mit hoher Bindungsaffinität für Rezeptoren auf der Zelloberfläche verwenden. Demgemäß werden hierin unter dem Begriff "ein spezifisch die Zielzellen erkennendes Molekül" zell- oder gewebespezifisch bindende Antikörper oder Peptide verstanden. Derartige Peptide können als Teile eines Rezeptor-Liganden-Systems bekannt sein oder lassen sich z.B. mittels eines Durchsuchens einer kombinatorischen Peptidbank isolieren (Lu, Z. et al. (1995) Biotechnol. 13, 366; U.S. Patent No. 5,635,182; Koivunen, E. et al. (1999) J. Nucl. Med. 40, 883). Neben den beschriebenen Peptiden sind eine Reihe weiterer Moleküle denkbar, die ebenfalls zur spezifischen Erkennung einer Zielzelle beitragen können. Hierzu gehören neben pharmakologischen Wirkstoffen auch Nukleinsäure-Aptamere, die Strukturen auf der Zelloberfläche spezifisch binden können (Hicke, B.J. et al. (1996) J. Clin. Invest. 98, 2688). Moleküle, die den Gentransfer in die Zellen erleichtern, können auf unterschiedliche Weise wirken. Sie können einerseits aus Proteinen oder Peptiden bestehen, die an eine DNA oder

- 10 -

eine synthetische Peptid-Nukleinsäure gebunden vorliegen und den Transport der Nukleinsäure in den Zellkern der Zelle erleichtern (Schwartz, B. et al. (1999) Gene Therapy 6, 282; Brandén, L.J. et al. (1999) Nature Biotechnology 17, 784). Weiterhin kann es sich um Moleküle handeln, die die Freisetzung der 5 Nukleinsäure in das Zytoplasma der Zelle verbessern (Planck, C. et al. (1994) J. Biol. Chem. 269, 12918; Kichler, A. et al. (1997) Bioconjug. Chem. 8, 213), oder um Moleküle, die die Stabilität der Nukleinsäure in der Zelle verbessern, wie die DNA-kondensierenden kationischen Polymere Poly-L-Lysin und Polyethylenimin (Lechardeur, D. et al. (1999) Gene Therapy 6, 482).

10

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung, das die folgenden Schritte umfaßt:

15 (i) Bereitstellen eines Gemisches aus mindestens einem entsprechenden kationischen Lipid (KL) und mindestens einem entsprechenden nicht-kationischen Lipid (NKL), und Bereitstellen mindestens einer hierin definierten Nukleinsäure;

20 (ii) Vermischen des Gemisches aus (KL) und (NKL) mit der mindestens einen Nukleinsäure (N);

(iii) ggf. Lyophilisieren; und

(iv) ggf. Rekonstituieren.

Unter dem "Bereitstellen" der genannten Ausgangsstoffe wird hierin sowohl das 25 vorangehende Herstellen eines Ausgangsstoffs als auch das Verwenden eines bereits hergestellten, möglicherweise im Handel erhältlichen, Ausgangsstoffs verstanden. Im letzteren Falle kann es empfehlenswert sein, die jeweiligen Konzentrationsangaben vor Verwendung zu überprüfen und ggf. entsprechend einzustellen.

30

Üblicherweise wird in Schritt (ii) das Gesamtlipid aus (KL) und (NKL) und die Nukleinsäure (N) im Verhältnis von ca. 1:1 bis ca. 10:1, jeweils bezogen auf das Gewicht, vermischt werden. Es ist ersichtlich, daß sämtliche zwischen diesen Werten liegenden Gewichtsverhältnisse von der vorliegenden Offenbarung mitumfaßt sind, z.B. ca. 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, insbesondere auch alle Gewichtsverhältnisse, die jeweils um den Wert 0,1 ansteigen, z.B. 4,1:1, 4,2:1, usw. Besonders bevorzugt sind Gewichtsverhältnisse von ca. 4:1 bis ca. 5:1, da sich bei diesen Verhältnissen eine überraschend hohe Transfektionseffizienz, insbesondere *in vivo*, feststellen läßt.

10

In einer bevorzugten Ausführungsform des vorgeschlagenen Verfahrens erfolgt in Schritt (i) die Bereitstellung des Gemischs aus (KL) und (NKL) und/oder die Bereitstellung der Nukleinsäure (N) unter Verwendung eines stabilisierenden Mittels, insbesondere mindestens eines Zuckers, mindestens eines anorganischen 15 Salzes und/oder mindestens eines mehrwertigen Alkohols. Wie oben ausgeführt, wirkt dieses Mittel insbesondere nachteiligen Wirkungen einer eventuellen Lyophilisierung entgegen. Das stabilisierende Mittel kann in Form einer isoosmotischen (ca. 300-330 mOsm) Lösung verwendet werden. Ein besonders bevorzugtes Beispiel eines stabilisierenden Mittels ist eine Kombination aus 20 Saccharose als Zucker und NaCl als anorganischem Salz. Es ist vorteilhaft, diese Kombination in Form einer isoosmotischen wäßrigen Lösung einzusetzen, beispielsweise mit einer Konzentration von 100 mM Saccharose/100 mM NaCl oder 250 mM Saccharose/25 mM NaCl. Nukleinsäure-Lipid-Komplexe, die unter Verwendung der letztgenannten Lösungen hergestellt wurden, weisen eine 25 besonders gute Stabilität auf und bewirken eine effiziente Transfektion *in vitro* und *in vivo*.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher eine pharmazeutische Zusammensetzung, die nach dem hierin vorgeschlagenen 30 Verfahren erhalten werden kann.

Die vorliegende Erfindung umfaßt als Gegenstand weiterhin die Verwendung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung in der Gentherapie einschließlich einer Kombinationstherapie mit pharmakologischen Wirkstoffen. Dabei kann es zweckmäßig sein, eine Gentherapie mit weiteren therapeutischen

5 Ansätzen zu kombinieren, wie z.B. der Applikation von pharmakologischen Wirkstoffen einschließlich Proteinen und/oder Peptiden. Beispielsweise kann eine Gentherapie mit iNOS kombiniert werden mit einer Applikation von Nitraten, Kalzium-Antagonisten und/oder  $\beta$ -Adrenorezeptor-Antagonisten (in Hinsicht auf letztere Applikation siehe Dieterich, H.A. et al. (Hrsg.) Koronare Herzkrankheit,

10 WVG GmbH, Stuttgart, 1993). Bevorzugt ist die Behandlung von Gefäßerkrankungen, genetisch bedingten Erkrankungen und/oder durch Gentransfer therapierbaren Erkrankungen einschließlich deren Prävention. Besonders bevorzugt ist ihre Verwendung zur Behandlung und Prävention von peripheren und/oder koronaren Gefäßerkrankungen. Beispiele sind u.a.

15 Bluthochdruck, Arteriosklerose, einschließlich der Arteriosklerose von Transplantaten sowie die Stenose oder Restenose von Gefäßen einschließlich Gefäßtransplantaten, insbesondere auch der koronaren Herzkrankheit und des Myokardinfarkts. Die Behandlung/Prävention der Stenose von Gefäßen einschließlich Gefäßtransplantaten, der Restenose nach einer perkutanen

20 transluminalen Angioplastie (PTA) von koronaren und/oder peripheren Gefäßen, einer Mangeldurchblutung von Geweben (hierbei wird die Revaskularisierung der ischämischen Gewebe angestrebt), der koronaren Herzkrankheit, des Myokardinfarkts und/oder der Gefäßarteriosklerose, insbesondere nach Transplantation von Gefäßen und/oder Organen, ist hierbei wiederum besonders

25 bevorzugt. Eine weitere bevorzugte Ausführungsform ist die Verwendung der hierin beschriebenen pharmazeutischen Zusammensetzung für die lokale somatische Gentherapie. Hierbei können therapeutisch wirksame Gene über einen somatischen Gentransfer lokal in die Gefäßwand übertragen und dort exprimiert werden, was im Vergleich zu der lokalen Applikation von Medikamenten eine

30 Verlängerung der therapeutischen Wirkung ermöglicht (siehe z.B. DE 197 29 769). Besonders bevorzugt ist die lokale somatische Gentherapie unter Einsatz

einer minimalinvasiven und effizienten Kathetertechnologie, mit der gezielt einzelne Gefäßabschnitte *in vivo* transfiziert werden können. Für diesen Zweck ist ein Infiltrator®-Katheter (siehe z.B. DE 197 29 769) besonders bevorzugt.

5    Üblicherweise wird die pharmazeutische Zusammensetzung mit einer Gesamtdosis in einem Bereich von ca. 0,1 bis ca. 20 µg (einschließlich aller dazwischenliegenden Werte), bezogen auf die Gesamtmenge an Nukleinsäure, verabreicht. In diesem Zusammenhang ist dem Fachmann klar, daß als "dazwischenliegender Wert" jeder Wert zwischen den angegebenen Ober- und

10    Untergrenzen verstanden wird, wie 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, usw.; 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, usw., 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, usw.; 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, usw.; 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, usw.; 5,0, usw.; 6,0, usw.; 7,0, usw.; 8,0, usw.; 9,0, usw.; 10,0, usw.; 11,0, usw., 12,0, usw.; 13,0, usw.; 14,0, usw.; 15,0, usw.; 16,0, usw., 17,0, usw.; 18,0, usw.; 19,0, usw.; 20,0. Es liegt auf der Hand, daß die

15    tatsächlich eingesetzte Dosis, die genaue Zusammensetzung, die Zeit und die Art der Verabreichung sowie die weiteren Einzelheiten der Behandlung angesichts der vorliegenden Offenbarung variiert werden können. Als ein geeignetes Tiermodell kann entweder das normale Hausschwein (Schwartz, R.S. et al. (1990), Circulation 82, 2190; Karas, S.P. et al. (1992) J. Am. Coll. Cardiol. 20, 467) oder

20    das sog. Minischwein (Tumbleson, M.E. und Schook, L.B. (1996) Advances in swine in biomedical research, Plenum Press, New York, Bd. 2, 684; siehe auch Unterberg, C. et al. (1995) J. Am. Coll. Cardiol. 26, 1747) eingesetzt werden. Die in diesen Modellen ermittelten Ergebnisse können dann auf den Menschen entsprechend übertragen werden. Vorzugsweise wird die pharmazeutische

25    Zusammensetzung mit einer Gesamtdosis in einem Bereich von ca. 0,5 µg bis ca. 10 µg, besonders bevorzugt ca. 1 µg bis ca. 5 µg, jeweils bezogen auf die Gesamtmenge an Nukleinsäure, verabreicht.

Bei Verwendung der iNOS als therapeutisch wirksamem Gen läßt sich neben einer gefäßerweiternden und antithrombotischen Wirkung vor allem eine antiproliferative Wirkung auf die glatten Muskelzellen der Gefäßwand erzielen. In

dem vorgenannten Tiermodell wurde überraschenderweise *in vivo* bei einer Gesamtdosis von 2 µg DNA eine bessere Transfektionseffizienz festgestellt als bei einer Gesamtdosis von 10 µg. Bei Verwendung der HO-1 als therapeutisch wirksamem Gen lässt sich eine gefäßerweiternde und antithrombotische Wirkung 5 erzielen. Darüber hinaus wird die HO-1 in Transplantationsmodellen als entzündungshemmend und immunprotektiv beschrieben (Hancock et al. (1998), *supra*; und Soares et al. (1998), *supra*). Demgemäß kann die HO-1 als therapeutisch wirksames Gen in der hierin beschriebenen pharmazeutischen 10 Zusammensetzung auch zur Entzündungshemmung und Immunprotektion von Transplantaten eingesetzt werden. Die Einbringung eines HO-1-exprimierenden Plasmids, beispielsweise in Aorten-Transplantate bei der Ratte, soll die Entwicklung von Arteriosklerose in den transplantierten Gefäßabschnitten verhindern. In einem weiteren Schritt kann durch die Expression der HO-1 die 15 Entwicklung von Arteriosklerose in venösen Transplantaten verhindert werden, wozu sich ebenfalls die Tiermodelle Maus, Ratte, Schwein (s. oben) und Affe eignen. Der Gentransfer kann hier entweder mittels eines Infiltrator®-Katheters in die Gefäßwand erfolgen oder durch Perfusion der Gefäßtransplantate. Ein zentrales klinisches Anwendungsgebiet ist somit die Verhinderung der Arteriosklerose in Gefäß- und Organtransplantaten. Daneben ist ein Einsatz zur 20 Behandlung der koronaren Herzkrankheit und des Myokardinfarkts, sowie von koronaren und peripheren Verschlußkrankheiten analog zur NOS möglich. Bei Verwendung von MCP-1 als therapeutisch wirksamem Gen in der hierin beschriebenen pharmazeutischen Zusammensetzung kann sowohl die Arteriogenese (d.h. die Bildung von Kollateralgefäßen aus bereits vorhandenen 25 Arteriolen), als auch die Angiogenese (d.h. die Bildung neuer Kapillaren) induziert werden. Die Einbringung eines MCP-1-exprimierenden Plasmids mittels eines Infiltrator®-Katheters in periphere oder koronare Gefäße ist dazu gedacht, die Revaskularisierung von ischämischen Geweben zu induzieren. Hierzu kann das von Ito et al. (*supra*) beschriebene Kaninchenmodell (insbesondere für 30 periphere Gefäße) eingesetzt werden, sowie die hierin beschriebenen Tiermodelle des Schweins (insbesondere zur Anwendung bei Koronargefäßen). Zur

Applikation ist für beide Spezies der Infiltrator®-Katheter vorgesehen. Therapeutische Anwendungsgebiete sind somit insbesondere die koronare Herzkrankheit, periphere Verschlußkrankheiten und der Myokardinfarkt. In einer besonderen Ausführungsform wird MCP-1 zusammen mit GM-CSF verwendet.

5 "Colony-stimulating factors" (CSFs) sind Proteine, die die Proliferation und Differenzierung von hämatopoietischen Vorläuferzellen vermitteln. Die Mitglieder dieser Proteinfamilie sind nach den Zelltypen benannt, deren Proliferation bzw. Differenzierung sie stimulieren: M-CSF (auch CSF-1 genannt, sowie seine alternativen Spleißformen wie CSF-4) wirkt spezifisch auf

10 Makrophagen, G-CSF (CSF-3) auf Granulozyten, während GM-CSF (CSF-2) beide Zelltypen stimuliert. Ein weiteres Mitglied dieser Proteinfamilie ist Multi-CSF, das als Interleukin-3 bekannt ist. Die cDNA-Sequenz des humanen GM-CSF wurde von Wong, G.G. et al. (Science 228, 810, 1985) beschrieben. In der Arteriogenese bewirkt GM-CSF, gegebenenfalls in synergistischer Wirkung mit

15 MCP-1, die Aktivierung und Proliferation von Makrophagen, was die Bildung von Kollateralgefäßen aus Arteriolen zur Folge hat (WO 99/17798).

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur therapeutischen und/oder prophylaktischen Behandlung eines Subjekts, wobei das

20 Verfahren das Verabreichen einer wirksamen Menge der vorstehend beschriebenen pharmazeutischen Zusammensetzung umfaßt.

Schließlich betrifft ein weiterer Aspekt der Erfindung die Verwendung einer isoosmotischen Zusammensetzung umfassend mindestens ein Mono- und/oder

25 Disaccharid, und/oder mindestens einen mehrwertigen Alkohol und/oder mindestens ein anorganisches Salz zur Stabilisierung von Nukleinsäure-Lipid-Komplexen in Lösung und/oder bei Lyophilisierung und/oder Rekonstituierung. Bei Verwendung der Zusammensetzung zur Stabilisierung von Nukleinsäure-Lipid-Komplexen in Lösung sind insbesondere die in der nachfolgenden Tabelle

30 aufgeführten Ausführungsformen 1-5, zur Stabilisierung bei Lyophilisierung und/oder Rekonstituierung insbesondere die Ausführungsformen 1-6 bevorzugt.

Besonders vorteilhaft für diese Zwecke ist die Verwendung einer Zusammensetzung, die Saccharose als Disaccharid und Natriumchlorid als anorganisches Salz enthält. Ein Beispiel für eine derartige isoosmotische Zusammensetzung (z.B. 300 mOsm) ist eine Kombination von Natriumchlorid in einer Konzentration in einem Bereich von ca. 5 mM bis ca. 100 mM, insbesondere 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 mM, mit einem entsprechenden Anteil an Saccharose. Des weiteren ist die Verwendung einer Zusammensetzung enthaltend Mannit allein oder in Kombination mit mindestens einem weiteren Mono- und/oder Disaccharid wie z.B. Saccharose oder Trehalose für die vorgenannten Zwecke bevorzugt.

5 Beispielsweise kann eine derartige isoosmotische Zusammensetzung (z.B. 300 mOsm) eine Kombination von Mannit in einer Konzentration in einem Bereich von ca. 10-290 mM, insbesondere ca. 150-290 mM, und Saccharose bzw. Trehalose entsprechend in einer Konzentration in einem Bereich von ca. 10-290 mM, insbesondere ca. 10-150 mM, enthalten.

10

15

Ausführungsform	M-/D-Saccharid	mehrw. Alkohol	anorg. Salz
1	+	+	
2	+		+
3	+	+	+
4		+	
5		+	+
6			+

Die folgenden Figuren und Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern, ohne sie darauf zu beschränken.

**BESCHREIBUNG DER FIGUREN**

Fig. 1 zeigt die Expression der iNOS *in vitro* in glatten Muskelzellen des Schweins: Vergleich der Expressionssysteme DAC-30, DMRIE-C und 5 FuGENE

Fig. 2 zeigt die Expression der iNOS *in vivo* in der A. femoralis des Schweins: Vergleich der Expressionssysteme DAC-30, FuGENE (Fig. 2A) und DMRIE-C (Fig. 2B)

Fig. 3 zeigt die Größe der DAC-30/DNA-Komplexe in Abhängigkeit vom 10 Lipid-DNA-Verhältnis

Fig. 4 zeigt die Expression der iNOS in der A. femoralis des Schweins: Einfluß der DNA-Dosis auf die Expressionseffizienz *in vivo*

Fig. 5 zeigt die Expression der iNOS *in vitro* in COS-7-Zellen: Expressions- 15 effizienz in den Transfektionslösungen L11-L15

Fig. 6 zeigt die Expression der iNOS *in vivo* in der A. femoralis des Schweins: Vergleich der Transfektionseffizienz in Lösung 11 und 15

Fig. 7 zeigt die Expression der iNOS *in vivo* in der A. femoralis des Schweins: Transfektionseffizienz in Lösung 15 nach Lyophilisierung und Rekonstitution

20 Fig. 8 zeigt die Expression der iNOS *in vivo* in der A. femoralis des Schweins: Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von der DNA-Dosis bei lyophilisierten/rekonstituierten Komplexen (Fig. 8A: Transfektion mittels Infiltrator®-Katheter; Fig. 8B: Transfektion mittels Infiltrator®-Katheter und Implantation eines Wiktor®-i-Stents)

## BEISPIELE

## I. Material und Methoden

## 5 1. Eingesetzte Transfektionssysteme

## 1.1 DAC-Chol enthaltende Formulierungen

Als Trägerstoff der liposomalen Formulierung fungiert DAC-30, das über die Firma G.O.T. (Berlin) vertrieben wird. DAC-30<sup>TM</sup> ist der Handelsname für ein Gemisch aus DAC-Cholesterol und dem neutralen Lipid DOPE im Gewichtsverhältnis 30:70 (DAC-Chol : DOPE), dessen Herstellung wie in WO 96/20208 und DE 196 23 916 beschrieben erfolgt. Auf entsprechende Weise lassen sich weitere Gemische von DAC-Chol zu DOPE herstellen wie DAC-40 (40:60) oder DAC-50 (50:50). Vor Verwendung wurden die Konzentrationsangaben überprüft.

## 1.2 Weitere Transfektionssysteme

Zu Vergleichszwecken wurden weiterhin DMRIE-C (1,2-Dimyristoyloxypropyl-3-dimethylhydroxyethylammoniumbromid) von LifeTechnologies (Rockville, Maryland, USA) und FuGENE<sup>TM</sup> (Boehringer Mannheim) eingesetzt.

## 2. Eingesetzte iNOS-Expressionsvektoren

25

2.1 Das Plasmid pSCMV-iNOS enthält die cDNA-Sequenz der murinen iNOS. Seine Herstellung ist in DE 44 11 402 beschrieben.

2.2 Das Plasmid pcDNA3-HsiNOS enthält die cDNA-Sequenz der humanen iNOS mit einem modifizierten 3'-Terminus. Die cDNA der humanen iNOS wurde hergestellt durch die Umschreibung von isolierter RNA aus stimulierten humanen Hepatozyten in cDNA. Diese wurde in den

Klonierungsvektor pGEM-T (Promega) insertiert, um zunächst das Plasmid pGEM-HsINOS zu konstruieren. Aus diesem wurde die cDNA mit den Restriktionsendonukleasen NotI und ApaI herausgeschnitten und in den Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen) eingefügt. Das so hergestellte Plasmid pcDNA3-HsINOS enthält die cDNA für die humane iNOS, wobei die 3'-terminale DNA-Sequenz kodierend für die vier C-terminalen Aminosäuren MSAL durch eine DNA-Sequenz kodierend für eine Insertion von 20 Aminosäuren (NPAAMAAGSMRRRALFYSVT) ausgetauscht wurde.

5 2.3 Plasmid pAH 1 wurde hergestellt durch Ausschneiden eines 0,9 kb großen Fragments enthaltend den 3'Terminus der humanen iNOS-cDNA mit der Restriktionsendonuklease SfiI aus dem Plasmid pcDNA3-HsINOS. Dieses Fragment wurde ersetzt durch Einsetzen eines 0,9 kb großen PCR-Fragments, das die 3'-terminale, native cDNA-Sequenz der humanen iNOS enthielt, in die SfiI-Schnittstelle.

10 2.4 Plasmid pAH 9 wurde durch Ausschneiden eines NotI-ApaI-Fragments, das die humane iNOS-cDNA-Sequenz enthielt, aus pAH 1 und Einsetzen dieses Fragments in das Plasmid pAH 7 erhalten. Letzteres wurde hergestellt durch Modifizierung von pcDNA3 (Invitrogen) mittels Herausschneiden eines 2 kb umfassenden BbsI-BsmI-Fragments, Auffüllen der 5'-Enden und Religation, wodurch die folgende Deletion eingeführt wurde: Teile der BGH-Polyadenylierungssequenz, der f1-Replikationsursprung, der SV40-Replikationsursprung, das Neomycinresistenzgen und Teile der SV40-Polyadenylierungssequenz. Weiterhin wurde die das Ampicillinresistenzgen enthaltende DNA-Sequenz mit dem Restriktionsenzym BspHI herausgeschnitten und durch ein PCR-Fragment mit dem Kanamycin-resistenzgen aus dem Plasmid pZErO-2 (Invitrogen) ersetzt.

15 20 25

## 3. Zur Stabilisierung der Lipid-Nukleinsäure-Komplexe einsetzbare Lösungen:

Bezeichnung	Inhalt
Lösung 1 (L1)	300 mM Mannit
Lösung 2 (L2)	50 mM Mannit 250 mM Saccharose
Lösung 3 (L3)	100 mM Mannit 200 mM Saccharose
Lösung 4 (L4)	150 mM Mannit 150 mM Saccharose
Lösung 5 (L5)	200 mM Mannit 100 mM Saccharose
Lösung 6 (L6)	250 mM Mannit 50 mM Saccharose
Lösung 11 (L11)	0,9 % NaCl
Lösung 12 (L12)	300 mM Glucose
Lösung 13 (L13)	300 mM Saccharose
Lösung 14 (L14)	100 mM Saccharose 100 mM NaCl
Lösung 15 (L15)	250 mM Saccharose 25 mM NaCl
Lösung 16 (L16)	300 mM Trehalose
Lösung 17 (L17)	50 mM Trehalose 250 mM Saccharose
Lösung 18 (L18)	100 mM Trehalose 200 mM Saccharose
Lösung 19 (L19)	150 mM Trehalose 150 mM Saccharose
Lösung 20 (L20)	200 mM Trehalose 100 mM Saccharose
Lösung 21 (L21)	250 mM Trehalose 50 mM Saccharose
Lösung 22 (L22)	50 mM Trehalose 250 mM Mannit
Lösung 23 (L23)	100 mM Trehalose 200 mM Mannit
Lösung 24 (L24)	150 mM Trehalose 150 mM Mannit
Lösung 25 (L25)	200 mM Trehalose 100 mM Mannit
Lösung 26 (L26)	250 mM Trehalose 50 mM Mannit

4. Eingesetzte Tiermodelle

Für die Studien wurden das sogenannte „Münchener Minischwein“ oder „Göttinger Minischwein“ eingesetzt (siehe Tumbleson, M.E. und Schook, L.B. (1996) *supra*; Unterberg, C. et al. (1995) *supra*). Letztere Versuchstiere können von der Universität Göttingen, Institut für Genetik und Tierzüchtung und der Firma Ellegaard Laboratory Pigs (Dalmose, Dänemark) bezogen werden. Durch Verwendung eines Injektionskatheters kann die Transfektion auf glatte Muskelzellen in der Media-Zellschicht von Blutgefäßen lokal begrenzt werden. Die Bezugsgröße ist die DNA-Dosis pro Injektion. Gegebenenfalls kann man auch die Plasmidkopienzahl pro Injektion als Bezugsgröße wählen. Im Fall von Plasmid pAH 9 mit einer Größe von 6915 Bp entsprechen beispielsweise 2 µg etwa  $2,6 \times 10^{11}$  Kopien. In den Beispielen 16 und 17 wurde das Göttinger Minischwein eingesetzt; in den anderen Versuchen das Münchener Minischwein.

15

5. Eingesetzte Kathetertechnologie

Es wurden der Infiltrator®-Katheter von IVT (San Diego, CA, USA), Modell DD140015 (siehe DE 197 29 769) und der Wiktor®-i-Stent von Medtronic (Minneapolis, MN, USA), Modell 6320 verwendet.

20 6. Herstellung und Transfektion von Lipoplexen aus DAC-30 und Plasmid-DNA  
enthaltend die humane iNOS cDNA

25 6.1 Herstellung des Transfektionsmediums

Im Falle von Lösung 15 wurde eine Lösung von 250mM Saccharose und 25mM NaCl in sterilem, pyrogenfreiem Wasser hergestellt. Diese Lösung wurde in der Sterilbank durch Filtration durch einen sterilen Filter mit 0,2 µm Porenweite sterilisiert.

30

## 6.2 Vorbereitung der DAC-30-Lösung

Die Gefäße mit DAC-30 wurden bis zu ihrer Rekonstituierung ungeöffnet bei -20°C gelagert. Die Rekonstituierung erfolgte durch Zugabe von sterilem, pyrogenfreiem Wasser (Endkonzentration 2 mg/ml). Die Gefäße wurden 5 verschlossen, 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend 2 min mit einem Vortex-Schüttler gemischt. Vor jeder Verwendung wurde die DAC-30-Lösung erneut 30 sec mit einem Vortex-Schüttler gemischt.

## 6.3 Herstellung der Lipid-Nukleinsäure-Komplexe aus DAC-30 und DNA

Alle hierfür notwendigen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen 10 durchgeführt. Die jeweilige DNA-Menge wurde in die Hälfte des benötigten Endvolumens an Transfektionslösung pipettiert. Zur anderen Hälfte des benötigten Endvolumens an Transfektionslösung wurde die vierfache Menge 15 an DAC-30 (bezogen auf das Gewicht) zugegeben. Die Lösungen wurden mit einem Vortex-Schüttler homogenisiert. Anschließend wurde die DAC-30-Lösung langsam tropfenweise zur DNA-Lösung zugegeben. Die entstehende Lösung wurde durch mehrmaliges Aufziehen in die Pipettenspitze oder durch Drehen des geschlossenen Reaktionsgefäßes gemischt.

Als ein typisches Beispiel soll die folgende Herstellung eines DAC-30/DNA-Gemischs mit einem Lipid-DNA-Verhältnis von 4:1 (w/w) zur Verabreichung 20 einer therapeutischen Dosis von 2 µg dienen: 7,5 µl DNA (bei einer Konzentration von 1 µg/µl entsprechend 7,5 µg) wurden durch Zugabe von Transfektionslösung auf ein Endvolumen von 750 µl gebracht und durch Mischen mit dem Vortex-Schüttler homogenisiert. Die vierfache Menge 25 DAC-30, d.h. 30 µg (bei einer Konzentration von 2 µg/µl entsprechend 15 µl), wurde ebenfalls in 750 µl Transfektionslösung aufgenommen und durch Mischen mit dem Vortex-Schüttler homogenisiert. Dann wurden 750 µl DAC-Lösung langsam tropfenweise in die 750 µl der DNA-Lösung pipettiert. Die entstehende Lösung enthielt in 1,5 ml Gesamtvolumen Lipid-DNA-Komplexe 30 mit einer DNA-Konzentration von 5 µg/ml. Diese Lösung war

über einen Zeitraum von mindestens 48 h bei 4°C stabil und konnte entweder sofort verwendet, oder wie nachfolgend beschrieben lyophilisiert und in 1,5 ml Wasser rekonstituiert werden. Es konnten dann 400 µl dieser Lösung wie nachfolgend beschrieben in die A. femoralis des Schweins injiziert werden, was einer therapeutischen Dosis von 2 µg DNA entspricht.

#### 6.4 Schema und Durchführung der Lyophilisierung

Die Gefäße enthaltend die DAC-30/DNA-Lipoplexe wurden unter sterilen Bedingungen eingefroren und es wurde eine Gefriertrocknung nach folgendem, beispielhaften Schema durchgeführt. Dem Fachmann ist ersichtlich, daß eine Gefriertrocknung auch unter abweichenden Bedingungen durchgeführt werden kann:

- 40 Stunden bei -37°C Stellflächentemperatur und 0,140 mbar Druck.
- Temperaturerhöhung der Stellfläche um 10°C/h bis 20°C erreicht sind.
- Nachtrocknung für 2h bei 0,01 mbar.

#### 6.5 Entnahme und Aufbewahrung der Proben

Die Entnahme der Proben erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die Lyophilisate wurden bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

#### 6.6 Vorbereiten der Proben für kathetervermittelte Transfektion *in vivo*

Die Lyophilisate (enthaltend eine definierte Menge an DAC-30/DNA-Komplexen) wurden unmittelbar vor der Operation in 1,5ml sterilem, pyrogenfreien Wasser rekonstituiert. Die Rücklösung wurde optisch kontrolliert.

#### 6.7 Transfektion der Gefäßwand mittels Infiltrator-Katheter *in vivo* (Modell Minischwein)

Ein Minischwein wurde intubiert, narkotisiert und für den chirurgischen Eingriff vorbereitet, woran sich eine Darstellung und Punktierung der linken Arteria carotis anschloß. Dann erfolgte die Positionierung des Führungsdrähtes für eine Schleuse, an die sich die Installation der Schleuse, sowie eine Gabe von 5.000 iU Heparin anschloß. Anschließend wurde eine Übersichts-Angiographie mit Standbild zur Darstellung der Morphologie der rechten und linken Arteria femoralis vorgenommen. Anhand dieses

Standbildes wurden die prospektiven Transfektionsstellen bestimmt. Als nächstes erfolgte die Positionierung des Führungsdrahts in der linken Arteria femoralis und die Angiographie-Darstellung der korrekten Position des Führungsdrähtes sowie das Aufziehen und Positionierung des IVT-Injektionskatheters mit anschließender Inflation des Ballon des IVT-Injektionskatheters mit 3,0 bar. Dann wurde eine Angiographie zur Kontrolle der vollständigen Gefäßokklusion vorgenommen. Es folgte eine manuelle Injektion von 300 µl bzw. 400 µl der rekonstituierten DAC-30/DNA-Komplexe unter ständiger Kontrolle des Ballondrucks. Anschließend wurde der Katheter entfernt und optional ein Stent-Implantat mit 12 bar für 20s unter angiographischer Kontrolle exakt an der Injektionsstelle positioniert. Bei Implantation eines Stents erfolgte anschließend die Gabe von 1000-2000 iU Heparin. Nach einer Abschlußangiographie wurden alle Operationswunden verschlossen.

#### 15 6.8 Auswertung

Die Auswertung hinsichtlich der Transfektionseffizienz erfolgte durch immunhistochemische Färbung von Dünnschnitten der Blutgefäße, die 3 Tage nach Operation entnommen wurden (siehe DE 197 29 769 mit der Abweichung, daß Gefäße, in die ein Stent implantiert wurde, in Kunststoff eingebettet wurden. Die Schichtdicke der Dünnschnitte betrug bei Kunststoffpräparaten 4 µm und bei Gefrierschnitten 10 µm). Alternativ erfolgte die Auswertung hinsichtlich der Wirksamkeit durch Ultraschall-Untersuchung der Versuchstiere über einen Zeitraum von 3-4 Wochen und anschließende histochemische Bearbeitung von Dünnschnitten der entnommenen Gefäße.

#### 7. Biochemischer Nachweis der iNOS

Die Bildung von Stickoxid durch die iNOS wurde durch den Nachweis von Nitrit im Zellkultur-Überstand wie folgt nachgewiesen: In eine Flachbodenplatte mit 96 Vertiefungen wurden 100 µl des zu untersuchenden Zellkulturüberstands pipettiert. Zu den Proben wurden jeweils 50 µl einer

2 %-igen Sulfanilamidlösung in 2,5 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> und 50 µl einer 0,2 %-igen Naphthylethyldiaminlösung in 2,5 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> zugegeben. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption der Proben bei 540 nm mit einer Standardreihe (NaNO<sub>2</sub> in einer Konzentration von 0 µM, 1 µM, 5 2,5 µM, 5,0 µM, 10 µM, 20 µM bzw. 40 µM in Zellkulturmedium) verglichen.

## II. Beispiele

10

1. Vergleich liposomaler Transfektionsmittel zur Expression von Stickoxid-synthase *in vitro*: DAC-30, DMRIE-C und FuGENE™

Versuch: Es wurden Transfektionslösungen hergestellt bestehend aus kationischen Liposomen und dem Plasmid pSCMV-iNOS (murine iNOS-cDNA). Die 15 Transfektionslösungen wurden hergestellt durch Mischen einer konstanten Dosis von 8 µg DNA mit den kationischen Liposomen DAC-30 (1:5, w/w), DMRIE-C (1:2, w/v) bzw. FuGENE™ (1:1, w/v) in BSS-Puffer (137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 10 mM Tris/Cl pH 7,6). Glatte Muskelzellen aus der Aorta des Schweins wurden in Zellkulturschalen mit je 6 Vertiefungen kultiviert. Es wurden jeweils 20 500 µl Transfektionslösung (enthaltend DNA in einer Konzentration von 16 µg/ml) je Vertiefung zu den Zellen gegeben, für 1 h bei 37°C inkubiert und nach Austausch der Lösungen gegen Zellkulturmedium wurden die Zellen für 48 h weiterkultiviert. Anschließend wurde aus dem Zellkulturüberstand der 25 transfizierten Zellen die Menge an akkumuliertem Nitrit im Vergleich zu einer Kontrolltransfektion ohne DNA bestimmt (s. I.7).

Ergebnis: Die Expression der induzierbaren Stickoxidsynthase (iNOS) *in vitro* war abhängig vom verwendeten Lipid. Eine Transfektionslösung enthaltend DAC-30/iNOS-DNA führte *in vitro* zu einer geringeren Expression der 30 induzierbaren Stickoxidsynthase als Transfektionslösungen enthaltend FuGENE/iNOS-DNA oder DMRIE-C/iNOS-DNA (siehe Fig. 1).

2. Vergleich liposomaler Transfektionsmittel zur Expression von Stickoxid-synthase *in vivo*: DAC-30, DMRIE-C und FuGENE™

Versuch: Es wurden Transfektionslösungen hergestellt bestehend aus kationischen Liposomen und dem Plasmid pSCMV-iNOS (murine iNOS-cDNA). Zur Herstellung der Transfektionslösung wurde eine Dosis von 10 µg Plasmid-DNA mit DAC-30 im Verhältnis 1:5 (w/w), mit DMRIE-C im Verhältnis 1:2 (w/v), bzw. mit FuGENE™ im Verhältnis 1:1 (w/v) in BSS-Puffer (137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 10 mM Tris/Cl pH 7,6) gemischt. Jeweils zwei Stellen der rechten und linken Arteria femoralis des Schweins wurden *in vivo* mittels eines Infiltrator®-Katheters (IVT) mit den wie beschrieben hergestellten Lösungen transfiziert. Nach einer Versuchsdauer von 3 Tagen erfolgte die Entnahme der transfizierten Gefäßabschnitte. Die Auswertung der immunhistochemischen Anfärbung von Dünnschnitten der entnommenen Gefäße mit einem monoklonalen Antikörper gegen induzierbare Stickoxidsynthase erfolgte qualitativ im Vergleich zu einem unbehandelten Kontrollgefäß.

Ergebnis: Transfektionslösungen enthaltend DAC-30/iNOS-DNA zeigten *in vivo* eine deutlich bessere Transfektionseffizienz als Liposomen-DNA-Komplexe enthaltend FuGENE™/iNOS-DNA oder DMRIE-C/iNOS-DNA. Dies war angesichts der in Beispiel 1 erhaltenen *in vitro*-Daten ein sehr überraschendes Ergebnis (siehe Fig. 2.A und 2.B).

3. DAC-30: Expression und Toxizität *in vitro* in Abhängigkeit vom Lipid-DNA-Verhältnis

Versuch: Glatte Muskelzellen aus der Aorta des Schweins (s. Beispiel 1) wurden in Zellkulturschalen mit je 6 Vertiefungen kultiviert und mit Liposomen-DNA-Komplexen bestehend aus DAC-30 und dem Plasmid pAH 1 (humane iNOS-cDNA) transfiziert. Zur Herstellung der Transfektionslösung (0,9 % NaCl, 2 mM

CaCl<sub>2</sub>) wurde DAC-30 mit einer konstanten Dosis von 4 µg DNA (entsprechend einer Konzentration von 8 µg/ml) im Verhältnis 2:1, 4:1, 5:1, 6:1 und 8:1 gemischt. Alternativ dazu wurde bei einem konstanten Liposomen-DNA-Verhältnis von 5:1 eine DNA-Dosis von 2 µg/ml, 4 µg/ml, 8 µg/ml bzw. 16 µg/ml 5 zur Herstellung der Transfektionslösung eingesetzt. Es wurden jeweils 500 µl Transfektionslösung je Vertiefung zu den Zellen zugegeben, für 1 h bei 37°C inkubiert und nach Austausch der Lösungen gegen Zellkulturmedium für 48 h weiterkultiviert. Nach 48h wurde aus dem Zellkulturüberstand der transfizierten Zellen die Menge an akkumuliertem Nitrit im Vergleich zu einer 10 Kontrolltransfektion ohne DNA in Transfektionslösung (0,9 % NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>) bzw. zu untransfizierten Zellen (Medium) bestimmt (s. I.7). Parallel wurde die Zytotoxizität der Transfektionslösung durch einen Vitalitätstest (Aufnahme von Neutralrotlösung) getestet.

15 Ergebnis: Die Expression der induzierbaren Stickoxidsynthase durch liposomale Komplexe enthaltend DAC-30/iNOS-DNA war abhängig vom Lipid-DNA-Verhältnis bei der Herstellung der Komplexe. Die Expression des Transgens war bei einer konstanten Dosis von 4 µg iNOS-Plasmid (Konzentration 8 µg/ml) optimal für ein Lipid-DNA-Verhältnis von 5:1. Gleichzeitig wiesen diese 20 liposomalen Komplexe eine geringe Zytotoxizität bei Transfektion *in vitro* auf. Beim einem geeigneten Liposomen-DNA-Verhältnis von 5:1 zeigten Liposomen-DNA-Komplexe enthaltend DAC-30/iNOS-DNA eine optimale Expressionseffizienz bei einer DNA-Konzentration von 4 µg/ml bis 8 µg/ml und eine geringe Zytotoxizität bis zu einer DNA-Konzentration von 8 µg/ml. (Daten 25 nicht gezeigt).

#### 4. Komplexgröße in Abhängigkeit vom Lipid-DNA-Verhältnis

30 Versuch: Es wurde eine Transfektionslösung hergestellt bestehend aus Komplexen von DAC-30 und dem Plasmid pAH 9 (humane iNOS-cDNA) in Kochsalzlösung (0,9 % NaCl/2 mM CaCl<sub>2</sub>). Zur Herstellung der Liposomen-

DNA-Komplexe wurde DAC-30 im Gewichtsverhältnis 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1 und 8:1 zur Plasmid-DNA eingesetzt bei einer konstanten DNA-Konzentration von 6,7 µg/ml DNA. Die Größenbestimmung der Komplexe erfolgte durch Photonenkorrelations-Spektroskopie (Zetasizer).

5

Ergebnis: Lipid-DNA-Gemische enthaltend DAC-30/iNOS-DNA bildeten bei einer konstanten DNA-Konzentration von 6,7 µg/ml in Abhängigkeit vom Lipid-DNA-Verhältnis (2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 8:1) Komplexe zunehmender Partikelgröße aus (siehe Fig. 3).

10

5. Komplexgröße in Abhängigkeit von DNA-Menge beeinflußt die Expressionseffizienz *in vivo*

Versuch: Es wurden Lipid-DNA-Gemische hergestellt bestehend aus Komplexen von DAC-30 und dem Plasmid pcDNA3-HsINOS (humane iNOS-cDNA mit modifiziertem 3'-Terminus) in einer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>). Zur Herstellung der Liposomen-DNA-Komplexe wurde DAC-30 im Verhältnis 5:1 zur Plasmid-DNA eingesetzt bei einer DNA-Dosis von 2 µg (Konzentration 6,7 µg/ml) bzw. 10 µg DNA (Konzentration 33,3 µg/ml). Unmittelbar nach Herstellung wurde die Größe der gebildeten Komplexe durch Photonenkorrelations-Spektroskopie (Zetasizer) bestimmt. Mit entsprechend hergestellten Transfektionslösungen wurden jeweils zwei Stellen der rechten und linken Arteria femoralis des Schweins *in vivo* mittels Infiltrator<sup>TM</sup>-Katheter transfiziert. Nach einer Versuchsdauer von 3 Tagen erfolgte die Entnahme der transfizierten Gefäßabschnitte. Die Auswertung der immunhistochemischen Anfärbung von Dünnschnitten der entnommenen Gefäße mit einem monoklonalen Antikörper gegen induzierbare Stickoxidsynthase erfolgte qualitativ im Vergleich zu einem unbehandelten Kontrollgefäß.

30 Ergebnis: Die frisch hergestellten Lipid-DNA-Gemische enthaltend DAC-30/iNOS-DNA im Verhältnis 5:1 bildeten bei einer Dosis von 2 µg iNOS-Plasmid

(entsprechend einer Konzentration von 6,7 µg/ml) Komplexe einer geringeren Partikelgröße (ca. 580 nm) aus, als bei einer Dosis von 10 µg iNOS-Plasmid (entsprechend einer Konzentration von 33,3 µg/ml (ca. 1000 nm). Bei Transfektion in die Gefäßwand der Arteria femoralis des Schweins *in vivo* zeigten 5 diese Gemische bei einer Dosis von 2 µg iNOS-Plasmid eine bessere Transfektionseffizienz als bei einer Dosis von 10 µg iNOS-Plasmid. Die bessere Transfektionseffizienz einer geringeren Dosis *in vivo* (siehe Fig. 4) war überraschend und korreliert mit einer geringeren Partikelgröße der DNA-Liposomen-Komplexe bei dieser Dosis.

10

6. Wirksamkeit: Verhinderung der Neointimabildung nach Transfektion von iNOS-DNA/DAC-30

Versuch: Es wurden Transfektionslösungen hergestellt bestehend aus DAC-30 15 und 0,7 µg (entsprechend einer DNA-Konzentration von 2,3 µg/ml) des Plasmids pAH1 (humane iNOS-cDNA) bzw. des Kontrollplasmids pcDNA3 (ohne cDNA-Insertion) im Verhältnis 5:1 in einer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl/2 mM CaCl<sub>2</sub>). Jeweils zwei Stellen der rechten und linken Arteria femoralis des Schweins 20 wurden *in vivo* mittels Infiltrator®-Katheter (IVT) mit den wie beschrieben hergestellten Lösungen transfiziert. Anschließend wurde zur Induktion der Neointima-Bildung ein Wiktor®-i-Stent (Medtronic) an jeder Transfektionsstelle plaziert. Nach einer Versuchsdauer von 6 Wochen erfolgte die Entnahme der transfizierten Gefäßabschnitte. Die Auswertung von Dünnschnitten der entnommenen Gefäße erfolgte quantitativ durch Morphometrie im Vergleich zur 25 Kontrolle (Plasmid pcDNA3) (n = 3).

Ergebnis: Die Expression der iNOS nach Transfektion von Lösungen enthaltend DAC-30/iNOS-DNA in die Arteria femoralis des Schweins *in vivo* bewirkte eine 30 Reduktion der Neointima-Bildung (bestimmt als Verhältnis von Neointima zu Media) um ca. 20 % (Daten nicht gezeigt).

## 7. Zeitabhängige Stabilität von Lipid-DNA-Komplexen

Versuch: Es wurden Lipid-DNA-Gemische hergestellt bestehend aus DAC-30 und dem Plasmid pAH 9 (humane iNOS-cDNA) im Verhältnis 4:1 und 5:1 bei einer 5 ansteigenden DNA-Konzentration von 2,3 µg/ml, 6,7 µg/ml und 13,3 µg/ml in Lösung 11 (0,9 % NaCl). Die Größe der entstehenden Liposomen-DNA-Komplexe wurde sofort nach Herstellung bzw. nach einer Standzeit von 3 h bei 4 °C durch Photonenkorrelations-Spektroskopie (Zetasizer) bestimmt.

10 Ergebnis: Lipid-DNA-Gemische enthaltend DAC-30/iNOS-DNA bildeten bei einem Lipid-DNA-Verhältnis von 4:1 Komplexe in einem definierten Größenbereich von ca. 540 bis 700 nm aus, die auch bei steigender DNA-Konzentration von 2,3 µg/ml, 6,7 µg/ml und 13,3 µg/ml über einen Zeitraum von 3 h bei 4 °C konstant blieb. Diese konstante Partikelgröße ist ein Maß für die 15 Stabilität der Komplexe. Hingegen nahm bei einem Lipid-DNA-Verhältnis von 5:1 die Größe der Komplexe bei ansteigender DNA-Menge von 2,3 µg/ml, 6,7 µg/ml und 13,3 µg/ml über einen Zeitraum von 3 h bei Raumtemperatur wie folgt zu: Bei 2,3 µg/ml im Mittel um den Faktor 2 von ca. 650 nm auf ca. 1280 nm, bei 6,7 µg/ml um den Faktor 3 von ca. 740 nm auf ca. 2200 nm und bei 20 13,3 µg/ml um den Faktor 2,5 von ca. 940 nm auf ca. 2300 nm. Diese zeitabhängige Größenzunahme bedeutet, daß die Komplexe instabil waren. (Daten nicht gezeigt).

## 8. Zeitabhängige Stabilität von Lipid-DNA-Komplexen in verschiedenen 25 Transfektionslösungen

Versuch: Es wurde ein Lipid-DNA-Gemisch hergestellt bestehend aus DAC-30 und dem Plasmid pAH 9 (humane iNOS-cDNA) im Verhältnis 4:1 bei einer konstanten DNA-Konzentration von 5 µg/ml. Die Herstellung dieser Liposomen-DNA-Komplexe erfolgte in verschiedenen Lösungen: L 12 (300 mM Glucose), 30 L 13 (300 mM Saccharose), L 14 (100 mM Saccharose, 100 mM NaCl), L 15

(250 mM Saccharose, 25 mM NaCl) oder L 11 (0,9 % NaCl). Die Größe der Liposomen-DNA-Komplexe wurde entweder sofort nach Herstellung oder nach Lagerung bei 4 °C für 3 h, 24 h bzw. 48 h durch Photonenkorrelations-Spektroskopie (Zetasizer) bestimmt.

5

Ergebnis: Lipid-DNA-Gemische enthaltend DAC-30/iNOS-DNA bildeten bei einem Lipid-DNA-Verhältnis von 4:1 und einer DNA-Konzentration von 5 µg/ml Komplexe in einem definierten Größenbereich von ca. 460 bis 610 nm aus. Diese Komplexgröße blieb in den Transfektionslösungen L 13, L 14 und L 15 über 10 einen Zeitraum von 3 h bis 48 h bei 4°C weitgehend konstant (Zunahme ca. um Faktor 1,2 in Lösung 13, ca. um Faktor 1,4 in Lösung 14 bzw. ca. um 1,1 in Lösung 15), d.h. die gebildeten Komplexe waren stabil. DAC-30/DNA-Komplexe hingegen, die in L 11 hergestellt worden waren, zeigten über einen Zeitraum von 15 3 h bis 48 h eine deutliche Zunahme der Partikelgröße ca. um den Faktor 2,5, d.h. die gebildeten Komplexe waren instabil. Eine leichte Zunahme der Partikelgröße, ca. um den Faktor 1,6, wurde auch in Lösung 12 festgestellt. (Daten nicht gezeigt)

#### 9. Expressionseffizienz *in vitro* in verschiedenen Transfektionslösungen

20 Versuch: Es wurde eine Transfektionslösung hergestellt bestehend aus DAC-30 und dem Plasmid pAH 9 (humane iNOS- cDNA) in den Lösungen L 12 (300 mM Glucose), L 13 (300 mM Saccharose), L 14 (100 mM Saccharose, 100 mM NaCl), L 15 (250 mM Saccharose, 25 mM NaCl) oder L 11 (0,9% NaCl). Zur Herstellung der Transfektionslösung wurde DAC-30 im Verhältnis 4:1 einer 25 konstanten DNA-Menge von 2 µg (entsprechend einer Konzentration von 5 µg/ml) zugesetzt. Die Liposomen-DNA-Komplexe wurden sofort nach Herstellung in COS-7-Zellen transfiziert. Nach 48 h wurde das gebildete Nitrit im Zellkultur-Überstand nachgewiesen (s. I.7). Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten, die Expressionshöhe wurde über die Meßwerte 30 eines Neutralrot-Tests normalisiert (siehe Fig. 5).

5 Ergebnis: Die Expression der induzierbaren Stickoxidsynthase durch Lipid-DNA-Gemische enthaltend DAC-30/iNOS-DNA war weitgehend unabhängig von der Zusammensetzung der Transfektionslösung. Die Lösungen L 12, L 13, L 14 und L 15 zeigten eine mit L 11 vergleichbare Expressionseffizienz bei einem konstanten Lipid-DNA-Verhältnis von 4:1 und einer Dosis von 2 µg DNA (siehe Fig. 5).

#### 10. Transfektionseffizienz *in vivo* in Lösung 15 im Vergleich zu Lösung 11

10 Versuch: Es wurden Transfektionslösungen hergestellt bestehend aus DAC-30 und 2 µg des Plasmids pAH1 (humane iNOS-cDNA) im Verhältnis 5:1 in Lösung 15 (250 mM Saccharose, 25 mM NaCl) bzw. Lösung 11 (0,9 % NaCl). Jeweils zwei Stellen der rechten und linken Arteria femoralis des Schweins wurden *in vivo* mittels Infiltrator™-Katheter (IVT) mit den wie beschrieben hergestellten Lösungen transfiziert. Nach einer Versuchsdauer von 3 Tagen erfolgte die Entnahme der transfizierten Gefäßabschnitte. Quantitative Auswertung der immunhistochemischen Daten: Auftragung der Mittelwerte von 5 mittig in der Transfektionsstelle gelegenen Schnitten (Abstand jeweils 500 µm)(n = 2 Schweine).

20 Ergebnis: Liposomen-DNA-Komplexe enthaltend DAC-30/iNOS-DNA in L 15 zeigten *in vivo* bei einer Dosis von 2 µg iNOS-Plasmid eine bessere Transfektionseffizienz als in L 11 hergestellte Komplexe. Die bessere Wirksamkeit der Transfektionslösung L 15 *in vivo* war nach den vorliegenden *in vitro* generierten Daten (siehe Beispiel 10) nicht zu erwarten (siehe Fig. 6).

#### 11. Kurzzeit-Stabilität von DAC-30/DNA-Komplexen in Lösung 15

30 Versuch: Es wurde ein Lipid-DNA-Gemisch hergestellt bestehend aus DAC-30 und dem Plasmid pAH 9 (humane iNOS-cDNA) im Verhältnis 4:1 in Lösung 15 (250 mM Saccharose, 25 mM NaCl). Die DNA-Konzentration betrug 2,5 µg/ml,

10 µg/ml, 25 µg/ml, bzw. 50 µg/ml. Die Partikelgröße der Lipid-DNA-Gemische wurde sofort nach Herstellung bzw. Rekonstituierung der lyophilisierten Komplexe (0 h), sowie nach einer Standzeit von 3 h bei 4 °C durch Photonenkorrelations-Spektroskopie (Zetasizer) bestimmt.

5

Ergebnis: Lipid-DNA-Gemische enthaltend DAC-30/iNOS-DNA zeigten bei einem Lipid-DNA-Verhältnis von 4:1 und einer ansteigenden DNA-Konzentration von 2,5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml und 50 µg/ml in Lösung 15 über einen Zeitraum von 3 h eine konstante Partikelgröße (Größenzunahme 10 kleiner als 15 %). Diese konstante Partikelgröße über einen Zeitraum von mindestens 3 h bleibt vorteilhafterweise auch nach Lyophilisierung der Komplexe und anschließender Rekonstituierung in steriles Wasser stabil erhalten. Die Lyophilisierung hat somit keinen Einfluß auf die Kurzzeit-Stabilität der Liposomen-DNA-Komplexe. (Daten nicht gezeigt).

15

## 12. Langzeit-Stabilität von DAC-30/DNA-Komplexen in Lösung 15

Versuch: Es wurde ein Lipid-DNA-Gemisch hergestellt bestehend aus DAC-30 und dem Plasmid pAH 9 (humane iNOS-cDNA) im Verhältnis 4:1 in Lösung 15 (250 mM Saccharose, 25 mM NaCl). Die DNA-Konzentration betrug 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, bzw. 10 µg/ml. Durch Photonenkorrelations-Spektroskopie (Zetasizer) wurde die Partikelgröße der hergestellten Komplexe sofort (0 h), bzw. nach einer Standzeit von 3 h, 24 h und 48 h bestimmt. Die so hergestellten Transfektionslösungen enthielten eine Gesamtdosis von 1 µg, 2 µg, bzw. 4 µg 25 Plasmid-DNA und wurden sofort (0 h), bzw. nach einer Standzeit von 3 h, 24 h und 48 h in COS-7 Zellen transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde das akkumulierte Nitrit im Zellkultur-Überstand nachgewiesen (s. I.7). Parallel dazu wurde die Menge an zellulärem Protein bestimmt (n=3).

30 Ergebnis: Lipid/DNA-Gemische enthaltend DAC-30/iNOS-DNA zeigten bei einem konstanten Lipid-DNA-Verhältnis von 4:1 und einer zunehmenden DNA-

Konzentration von 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, und 10 µg/ml in Lösung 15 über einen Zeitraum von 48 h eine konstante mittlere Partikelgröße von ca. 480 nm, ca. 500 nm und ca. 510 nm. Die Transfektion von COS-7- Zellen mit diesen Lipid-DNA-Gemischen bewirkte eine gleichbleibende Expression des Transgens nach 5 einer Standzeit der Transfektionslösung von bis zu 48 h. In Lösung 15 hergestellte DAC-30/DNA-Komplexe zeigten vorteilhafterweise über eine Standzeit der Transfektionslösung von bis zu 48 h eine konstante Partikelgröße und Expressionseffizienz, die auch bei zunehmender DNA-Konzentration erhalten blieb. (Daten nicht gezeigt).

10

### 13. Transfektionseffizienz *in vivo*: Einfluß der DNA-Dosis

Versuch: Es wurden Transfektionslösungen hergestellt bestehend aus DAC-30 und 0,5 µg, 1 µg, bzw. 2 µg des Plasmids pAH 9 (humane iNOS-cDNA) bzw. des 15 Kontrollplasmids pAH 7 (ohne cDNA-Insertion) im Verhältnis 4:1 in Lösung 15 (250 mM Saccharose, 25 mM NaCl). Jeweils zwei Stellen der rechten und linken Arteria femoralis des Schweins wurden *in vivo* mittels Infiltrator™-Katheter (IVT) mit den wie beschrieben hergestellten Lösungen transfiziert. Anschließend wurde ein Wiktor®-i-Stent (Medtronic) an jeder Transfektionsstelle plaziert. Nach einer 20 Versuchsdauer von 3 Tagen erfolgte die Entnahme der transfizierten Gefäßabschnitte. Die Auswertung der immunhistochemischen Anfärbung von Dünnschnitten der entnommenen Gefäße mit einem monoklonalen Antikörper gegen induzierbare Stickoxidsynthase erfolgte quantitativ durch Morphometrie im Vergleich zur Kontrolle (Plasmid pAH 7 bzw. unbehandeltes Gefäß).

25

Ergebnis: Liposomen-DNA-Komplexe enthaltend DAC-30/iNOS-DNA in Lösung 15 zeigten *in vivo* bei einer Dosis von 2 µg iNOS-Plasmid eine bessere Transfektionseffizienz als 0,5 µg bzw. 1 µg (ca. 43 % gegenüber ca. 31,3 % bzw. 13 %, bezogen auf den Anteil der transfizierten Media an gesamter Media). 30 (Daten nicht gezeigt).

14. Transfektionseffizienz *in vivo* in Lösung 15 nach Lyophilisierung und Rekonstituierung

Versuch: Es wurde eine Transfektionslösung hergestellt bestehend aus DAC-30 und dem Plasmid pAH 9 (humane iNOS-cDNA) im Verhältnis 4:1 in Lösung 15. Zur Transfektion von jeweils einer Stelle der rechten bzw. linken Arteria femoralis des Schweins *in vivo* mittels Infiltrator®-Katheter wurde frisch hergestellte (Dosis 2 µg DNA) bzw. lyophilisierte und in steriles Wasser rekonstituierte Transfektionslösung (0,5; 1; und 2 µg DNA) eingesetzt. Anschließend wurde ein Wiktor®-i-Stent (Medtronic) an jeder Transfektionsstelle plaziert. Nach einer Versuchsdauer von 3 Tagen erfolgte die Entnahme der transfizierten Gefäßabschnitte. Die Auswertung der immunhistochemischen Anfärbung von Dünnschnitten der entnommenen Gefäße mit einem monokonalen Antikörper gegen induzierbare Stickoxidsynthase erfolgte quantitativ durch Morphometrie.

Ergebnis: Eine Transfektionslösung enthaltend DAC-30/iNOS-DNA in Lösung 15 (Dosis von 2 µg DNA) zeigte als rekonstituiertes Lyophilisat überraschenderweise eine um den Faktor 1,5 bessere Transfektionseffizienz *in vivo* als frisch hergestellte Komplexe (Fig. 7; von links nach rechts: Frisch hergestellte Transfektionslösung (2 µg); Kontrolle (2 µg); rekonstituierte Transfektionslösung (0,5; 1; und 2 µg DNA)).

15. Transfektionseffizienz *in vivo* mit lyophilisierten/rekonstituierten Komplexen: DNA-Dosisabhängigkeit

Versuch: Es wurden Transfektionslösungen hergestellt bestehend aus DAC-30 und 0,7 µg, 1 µg, 1,5 µg, 2 µg bzw. 4 µg des Plasmids pAH9 (humane iNOS-cDNA) bzw. des Kontrollplasmids pAH 7 (ohne cDNA-Insertion) im Verhältnis 4:1. Die DNA-Liposomen-Komplexe wurden in Lösung 15 hergestellt, lyophilisiert und unmittelbar vor der Transfektion in steriles Wasser rekonstituiert. Jeweils zwei Stellen der rechten und linken Arteria femoralis des

Schweins wurden *in vivo* mittels Infiltrator™-Katheter mit den wie beschrieben hergestellten Lösungen transfiziert (Fig. 8A). Das Experiment wurde alternativ mit Implantation eines Wiktor®-i-Stents durchgeführt (Fig. 8B). Nach einer Versuchsdauer von 3 Tagen erfolgte die Entnahme der Gefäße. Quantitative 5 Auswertung der immunhistochemischen Daten der Experimente mit und ohne Stentimplantation: Prozentualer Anteil der transfizierten Media aus den Mittelwerten von 10 µm-Schnitten in Abständen von jeweils 1 mm über den gesamten transfizierten Gefäßabschnitt.

10 Ergebnis: Liposomen-DNA-Komplexe enthaltend iNOS-DNA/DAC-30 zeigten als rekonstituiertes Lyophilisat in einer Dosis von 2 µg Plasmid-DNA *in vivo* eine bessere Transfektionseffizienz als in einer Dosis von 0,7 µg, 1 µg, 1,5 µg oder 4 µg (Fig. 8A). Die bessere Transfektionseffizienz bei einer Dosis von 2 µg *in vivo* wurde durch die Implantation eines Stents nicht beeinflußt (siehe Fig. 8B; 15 Implantation eines Wiktor®-i-Stents).

16. Wirksamkeit *in vivo*: Verhinderung der Neointimabildung durch Transfektion von 1 µg iNOS

20 Versuch: Es wurde eine Transfektionslösung hergestellt bestehend aus DAC-30 und 1 µg des Plasmids pAH9 (humane iNOS-cDNA) bzw. des Kontrollplasmids pAH 7 (ohne cDNA-Insertion) im Verhältnis 4:1 in Lösung 15. Die Lösung wurde lyophilisiert und unmittelbar vor Transfektion in jeweils eine Stelle der rechten und linken Arteria femoralis des Schweins *in vivo* mittels Infiltrator®-Katheter in 25 steriles Wasser rekonstituiert. Anschließend wurde zur Induktion der Neointima-Bildung ein Wiktor®-i-Stent (Medtronic) an jeder Transfektionsstelle plaziert. Nach einer Versuchsdauer von 28 Tagen erfolgte die Entnahme der transfizierten Gefäßabschnitte. Die Auswertung wurde durch intravaskuläre Ultraschall-Untersuchung der transfizierten Gefäßabschnitte vorgenommen und bewertete die 30 Reduktion der gebildeten Neointima nach Behandlung mit dem iNOS-Plasmid im

Vergleich zum Kontrollplasmid als Verhältnis der Plaquefläche zur gesamten Gefäßfläche (n=8).

Ergebnis: In Lösung 15 hergestellte Liposomen/DNA-Komplexe enthaltend eine 5 Dosis von 1 µg iNOS-DNA/DAC-30 bewirkten nach Lyophilisierung und Rekonstituierung in sterilem Wasser eine Reduzierung der Neointima-Bildung im Restenose-Modell Schwein *in vivo* um ca. 42%. (Daten nicht gezeigt).

17. Wirksamkeit *in vivo*: Verhinderung der Neointimabildung durch Transfektion 10 von 0,25 µg, 0,5 µg bzw. 1 µg iNOS

Es wird eine Transfektionslösung hergestellt bestehend aus DAC-30 und 0,25 µg, 15 0,5 µg, bzw. 1 µg des Plasmids pAH 9 (humane iNOS-cDNA) bzw. des Kontrollplasmids pAH 7 (ohne cDNA-Insertion) im Verhältnis 4:1 in Lösung 15. Die Lösung wird lyophilisiert und unmittelbar vor Transfektion in jeweils einer Stelle der rechten und linken Arteria femoralis des Schweins *in vivo* mittels 20 Infiltrator®-Katheter in sterilem Wasser rekonstituiert. Anschließend wird zur Induktion der Neointima-Bildung ein Wiktor®-i-Stent (Medtronic) an jeder Transfektionsstelle plaziert. Nach einer Versuchsdauer von 28 Tagen erfolgt die Entnahme der transfizierten Gefäßabschnitte. Die Auswertung wird durch 25 intravaskuläre Ultraschall-Untersuchung der transfizierten Gefäßabschnitte vorgenommen und bewertet die Reduktion der gebildeten Neointima nach Behandlung mit iNOS-Plasmid im Vergleich zum Kontrollplasmid als Verhältnis der Plaquefläche zur gesamten Gefäßfläche.

25  
18. Verhinderung der Transplantat-Arteriosklerose *in vivo* durch Gentherapie mit HO-1

Für das Experiment zur Verhinderung der Transplantat-Arteriosklerose werden 3- 30 3,5 kg schwere Kaninchen verwendet. Für den chirurgischen Eingriff, der unter sterilen Bedingungen durchgeführt wird, werden die Tiere narkotisiert. Der

Gentransfer in das Spendergefäß wird mittels eines Infiltrator®-Katheters durchgeführt, der über die freigelegte rechte Arteria carotis durch eine Schleuse mittels eines Führungsdrähts in die Arteria iliaca eingeführt wird. Die Injektion des HO-1-Expressionsplasmids in die Gefäßwand der Arteria iliaca mittels 5 Infiltrator®-Katheter erfolgt bei niedrigem Ballondruck (ca. 0,6 atm.). Dabei werden innerhalb von ca. 30 Sekunden 100-150 µl Transfektionslösung, bestehend aus DAC-30 und einem HO-1-Expressionsplasmid im Verhältnis 4:1 in Lösung 15 in die Gefäßwand injiziert. Der Sitz des aufgeblasenen Katheters wird angiographisch kontrolliert. Im Anschluß an die Entfernung des Katheters wird 10 das transfizierte Gefäßsegment entnommen und an entsprechender Stelle in die A. iliaca eines allogenen Empfängerkaninchens eingesetzt. Nach 2-4 Monaten wird mittels Histochemie untersucht, ob sich im Vergleich zu kontrollbehandelten Tieren die Entstehung von arteriosklerotischen Veränderungen in den 15 implantierten Gefäßen (intimale Hyperplasie, Leukozyteninfiltration) reduzieren läßt.

19. Induktion des Wachstums von Kollateralgefäßen *in vivo* durch Gentherapie mit MCP-1

20 Für das Experiment zur Induktion des Wachstums von Kollateralgefäßen werden 3-3,5 kg schwere Kaninchen (New Zealand White rabbits) verwendet. Für den chirurgischen Eingriff, der unter sterilen Bedingungen durchgeführt wird, werden die Tiere narkotisiert. Die freigelegte Arteria femoralis wird durch zwei Ligaturen im Abstand von 1,5-2 cm so abgebunden, daß die Äste der Arteria profunda 25 femoris, die Arteria circumflexa femoris lateralis und die Arteria circumflexa abdominis durchgängig bleiben. Für den Gentransfer wird ein Infiltrator®-Katheter verwendet, der über die freigelegte rechte Arteria carotis durch eine Schleuse mittels eines Führungsdrähts in die Femoralarterie eingeführt wird. Die Injektion des MCP-1-Plasmids in den proximal der Ligatur gelegenen 30 Gefäßabschnitt erfolgt mittels Infiltrator®-Katheter bei niedrigem Ballondruck (ca. 0,6 atm.). Dabei werden innerhalb von ca. 30 Sekunden 100-150 µl

Transfektionslösung, bestehend aus DAC-30 und einem MCP-1-Expressionsplasmid im Verhältnis 4:1 in Lösung 15 in die Gefäßwand injiziert. Der Sitz des aufgeblasenen Katheters wird angiographisch kontrolliert. Im Anschluß an die Entfernung des Katheters werden alle Operationswunden verschlossen. Nach 7 Tagen wird mittels Angiographie untersucht, ob sich im Vergleich zu kontrollbehandelten Tieren vermehrt Kollateralen gebildet haben. Mit histologischen Methoden wird die Proliferation von Endothelzellen und glatten Muskelzellen im Gefäßsystem der behandelten Gewebe im Vergleich zu kontrollbehandelten Tieren untersucht.

10

20. Induktion des Wachstums von Kollateralgefäßen *in vivo* durch Gentherapie mit MCP-1/GM-CSF

Für das Experiment zur Induktion des Wachstums von Kollateralgefäßen werden 15 3-3,5 kg schwere Kaninchen (New Zealand White rabbits) verwendet. Für den chirurgischen Eingriff, der unter sterilen Bedingungen durchgeführt wird, werden die Tiere narkotisiert. Die freigelegte Arteria femoralis wird durch zwei Ligaturen im Abstand von 1,5-2 cm so abgebunden, daß die Äste der Arteria profunda femoris, die Arteria circumflexa femoris lateralis und die Arteria circumflexa 20 abdominis durchgängig bleiben. Ca. 7-21 Tage nach dem Gefäßverschluß wird ein Gentransfer durchgeführt mit Plasmid-DNA, die zur Expression von MCP-1 bzw. GM-CSF in der Gefäßwand führt. Für den Gentransfer wird ein Infiltrator®-Katheter verwendet, der über die freigelegte rechte Arteria carotis durch eine Schleuse mittels eines Führungsdrähts in die Femoralarterie eingeführt wird. Die 25 Injektion von Plasmid-DNA in den proximal der Ligatur gelegenen Gefäßabschnitt mittels Infiltrator®-Katheter erfolgt bei niedrigem Ballondruck (ca. 0,6 atm.). Dabei werden innerhalb von ca. 30 Sekunden 100-150 µl Transfektionslösung, bestehend aus DAC-30 und Plasmid-DNA im Verhältnis 4:1 in Lösung 15 in die Gefäßwand injiziert. Der Sitz des aufgeblasenen Katheters 30 wird angiographisch kontrolliert. Im Anschluß an die Entfernung des Katheters werden alle Operationswunden verschlossen. Nach weiteren 7 Tagen wird mittels

- 40 -

Angiographie untersucht, ob sich im Vergleich zu kontrollbehandelten Tieren vermehrt Kollateralen gebildet haben. Mit histologischen Methoden wird die Proliferation von Endothelzellen und glatten Muskelzellen im Gefäßsystem der behandelten Gewebe im Vergleich zu kontrollbehandelten Tieren untersucht.

**Patentansprüche**

1. Pharmazeutische Zusammensetzung in Form eines Nukleinsäure-Lipid-Komplexes, enthaltend
  - (a) mindestens ein kationisches Lipid (KL);
  - (b) mindestens ein nicht-kationisches Lipid (NKL);
  - (c) mindestens eine Nukleinsäure (N) kodierend für ein Protein zur Behandlung von Gefäßkrankheiten, insbesondere ein Protein mit gefäßerweiternden und/oder gefäßbildenden Eigenschaften; und
  - (d) gegebenenfalls weitere Hilfs- und/oder Zusatzstoffe;

wobei das kationische Lipid (KL) eine von Cholesterin abgeleitete Gruppe enthält, an der über eine Verbindungsgruppe, ausgewählt aus Carboxamiden und Carbamoylen, und einen Spacer bestehend aus einer linearen oder verzweigten Alkylgruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen mindestens eine kationische Aminogruppe, ausgewählt aus primärer, sekundärer, tertiärer Aminogruppe und/oder einem quartären Ammoniumsalz, gebunden ist, und wobei die Größe der Nukleinsäure-Lipid-Komplexe in einem Bereich von ca. 300-800 nm liegt.
2. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei die Größe der Nukleinsäure-Lipid-Komplexe in einem Bereich von ca. 350-550 nm liegt.

3. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Nukleinsäure (N) für eine der Isoformen der Stickoxidsynthase (NOS), der Hämoxigenase (HO), des Monocyte Chemoattractant Protein (MCP), oder eine Variante eines dieser Proteine kodiert.  
5
4. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 – 3, wobei die Nukleinsäure für die induzierbare Stickoxidsynthase (iNOS), die Hämoxigenase-1 (HO-1), das Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), oder eine Variante davon, vorzugsweise für die jeweilige humane Form, kodiert.  
10
5. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 - 4, wobei das kationische Lipid (KL)  $3\beta$ -[N-(N,N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyl]cholesterin (DAC-Chol) oder  $3\beta$ -[N-(N',N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyl]cholesterin (DC-Chol) ist.  
15
6. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 - 5, wobei das nicht-kationische Lipid (NKL) ein Lipid ausgewählt aus mindestens einem Phosphatidylcholin, mindestens einem Phosphatidylethanolamin und/oder Cholesterin ist.  
20
7. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 6, wobei das Phosphatidylethanolamin ein Diacylphosphatidylethanolamin mit einer Kettenlänge von 10-28 Kohlenstoffatomen ist, vorzugsweise Dimyristoylphosphatidylethanolamin (DMPE), Dipalmitoylphosphatidylethanolamin (DPPE) und/oder Dioleylphosphatidylethanolamin (DOPE).  
25
8. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 7, wobei das kationische Lipid (KL) DAC-Chol ist und das nicht-kationische Lipid (NKL) DOPE ist, vorzugsweise in einem Gewichtsverhältnis von DAC-Chol zu DOPE von ca. 10:90 bis ca. 90:10, besonders bevorzugt von ca. 30:70.  
30

9. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 - 8, wobei die Zusammensetzung unter Einsatz von Gesamtlipid aus (KL) und (NKL) zu Nukleinsäure (N) im Verhältnis von ca. 1:1 bis ca. 10:1, vorzugsweise ca. 4:1 oder ca. 5:1, jeweils bezogen auf das Gewicht, erhalten worden ist.  
5
10. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 - 9, wobei die Zusammensetzung als Lösung oder als Lyophilisat vorliegt.
11. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 - 10, wobei der genannte Hilfsstoff ein stabilisierendes Mittel ist, insbesondere mindestens ein Zucker, mindestens ein mehrwertiger Alkohol und/oder mindestens ein anorganisches Salz.  
15
12. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 - 11, wobei der genannte Zusatzstoff mindestens ein spezifisch die Zielzellen erkennendes Molekül und/oder mindestens ein den Gentransfer in die Zellen erleichterndes Molekül ist.  
20
13. Verfahren zur Herstellung der pharmazeutischen Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 - 12, gekennzeichnet durch folgende Schritte:
  - (i) Bereitstellen eines Gemischs aus einem kationischen Lipid (KL) gemäß einem der Ansprüche 1 – 12 und einem nicht-kationischen Lipid (NKL) gemäß einem der Ansprüche 1 – 12, und Bereitstellen einer Nukleinsäure (N) gemäß einem der Ansprüche 1 – 12;  
25
  - (ii) Vermischen des Gemischs aus (KL) und (NKL) mit der Nukleinsäure (N);
  - (iii) gegebenenfalls Lyophilisieren; und
  - (iv) gegebenenfalls Rekonstituieren.  
30

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei in Schritt (ii) das Gesamtlipid aus (KL) und (NKL) und die Nukleinsäure (N) im Verhältnis von ca. 1:1 bis ca. 10:1, vorzugsweise ca. 4:1 oder ca. 5:1, jeweils bezogen auf das Gewicht, vermischt werden.  
5
15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, wobei in Schritt (i) die Bereitstellung des Gemisches aus (KL) und (NKL) und/oder die Bereitstellung der Nukleinsäure (N) unter Verwendung eines stabilisierenden Mittels, insbesondere mindestens eines Zuckers, mindestens eines mehrwertigen Alkohols und/oder mindestens eines anorganischen Salzes, erfolgt.  
10
16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei das stabilisierende Mittel in Form einer isoosmotischen wässrigen Lösung verwendet wird.  
15
17. Pharmazeutische Zusammensetzung erhältlich nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 13 – 16.  
18. Verwendung der pharmazeutischen Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 – 12 oder 17 bei der Herstellung eines Arzneimittels zur Verwendung in der Gentherapie einschließlich einer Kombinationstherapie mit pharmakologischen Wirkstoffen.  
20
19. Verwendung nach Anspruch 18 zur Behandlung von Gefäßerkrankungen, genetisch bedingten Erkrankungen und/oder durch Gentransfer therapierbaren Erkrankungen einschließlich deren Prävention.  
25
20. Verwendung nach Anspruch 18 oder 19 zur Behandlung und Prävention von peripheren und/oder koronaren Gefäßerkrankungen.
- 30
21. Verwendung nach Anspruch 20, wobei die Gefäßerkrankung die Stenose von Gefäßen einschließlich Gefäß-Transplantaten, die Restenose nach ei-

5 ner perkutanen transluminalen Angioplastie (PTA) von koronaren und/oder peripheren Gefäßen, eine Erkrankung infolge einer Mangel- durchblutung von Geweben, die koronare Herzkrankheit, der Myokardinfarkt, die Gefäßarteriosklerose und/oder eine Erkrankung, die zur Abstoßung von Gefäß- und/oder Organtransplantaten führt, ist.

22. Verwendung nach einem der Ansprüche 18 – 21 für die lokale somatische Gentherapie.

10 23. Verwendung nach Anspruch 22, wobei die Gentherapie unter Verwendung eines Katheters, insbesondere eines Infiltrator-Katheters, erfolgt.

15 24. Verwendung nach Anspruch 22 oder 23, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung mit einer Gesamtdosis in einem Bereich von ca. 0,1 - 20 µg, vorzugsweise ca. 0,5 - 10 µg, besonders bevorzugt ca. 1 - 5 µg, jeweils bezogen auf die Gesamtmenge an Nukleinsäure pro Applikation, verabreicht wird.

20 25. Verwendung einer isoosmotischen Zusammensetzung umfassend mindestens ein Mono- und/oder Disaccharid und/oder mindestens einen mehrwertigen Alkohol und/oder mindestens ein anorganisches Salz zur Stabilisierung von Nukleinsäure-Lipid-Komplexen in Lösung.

25 26. Verwendung einer isoosmotischen Zusammensetzung umfassend mindestens ein Mono- und/oder Disaccharid und/oder mindestens einen mehrwertigen Alkohol und/oder mindestens ein anorganisches Salz zur Stabilisierung von Nukleinsäure-Lipid-Komplexen bei Lyophilisierung und/oder Rekonstituierung.

30 27. Verwendung nach Anspruch 25 oder 26, wobei das Disaccharid Saccharose und das anorganische Salz Natriumchlorid ist.



1/9

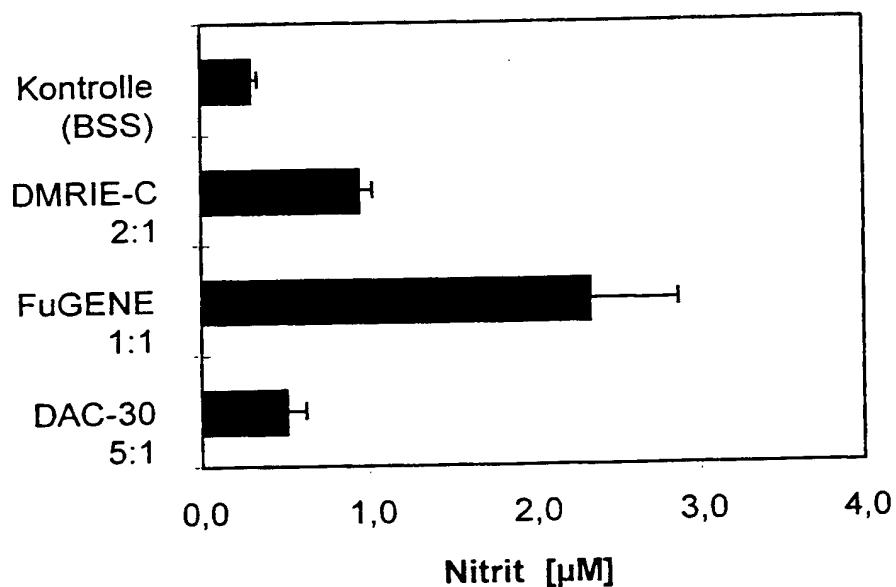


Fig.1



2/9

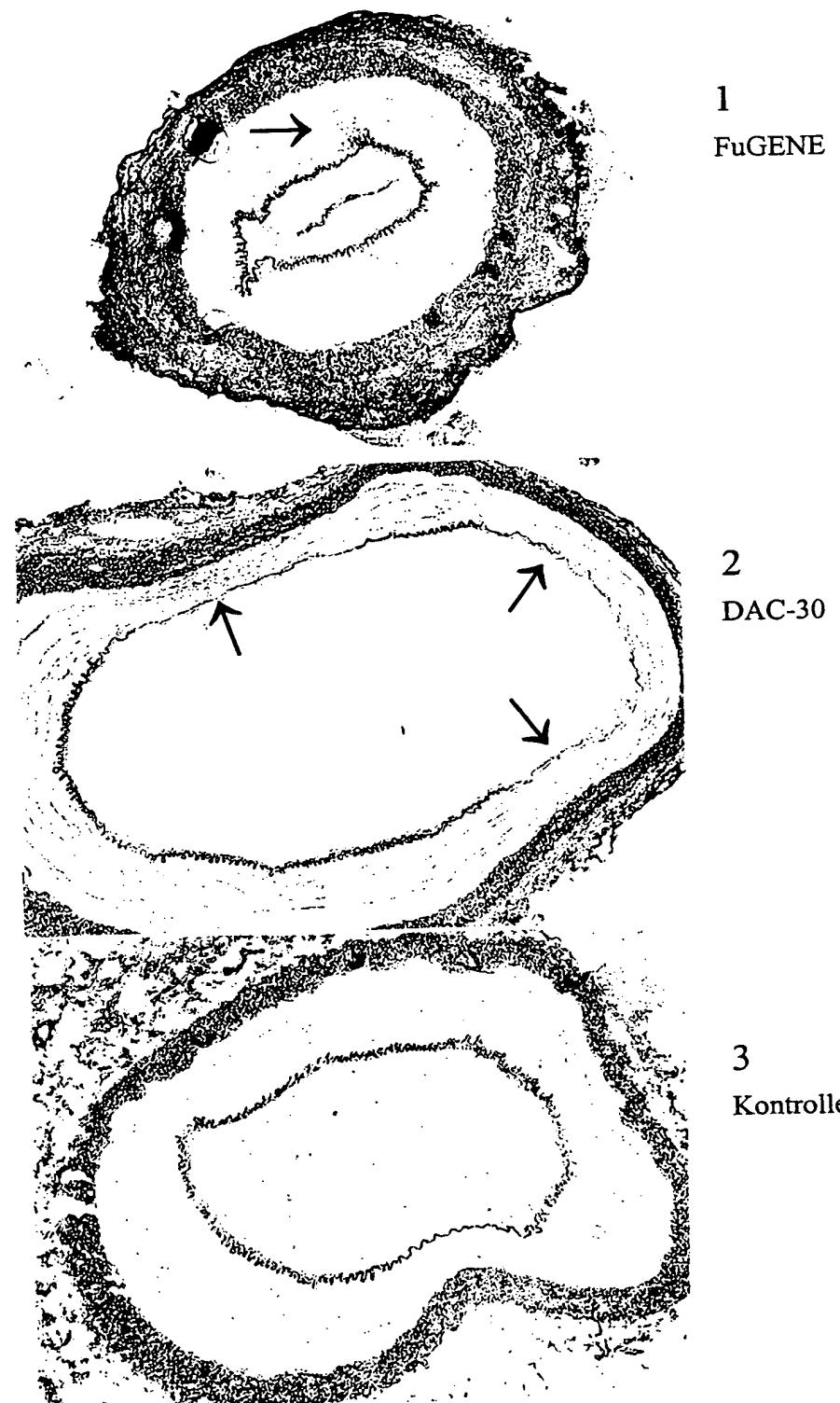
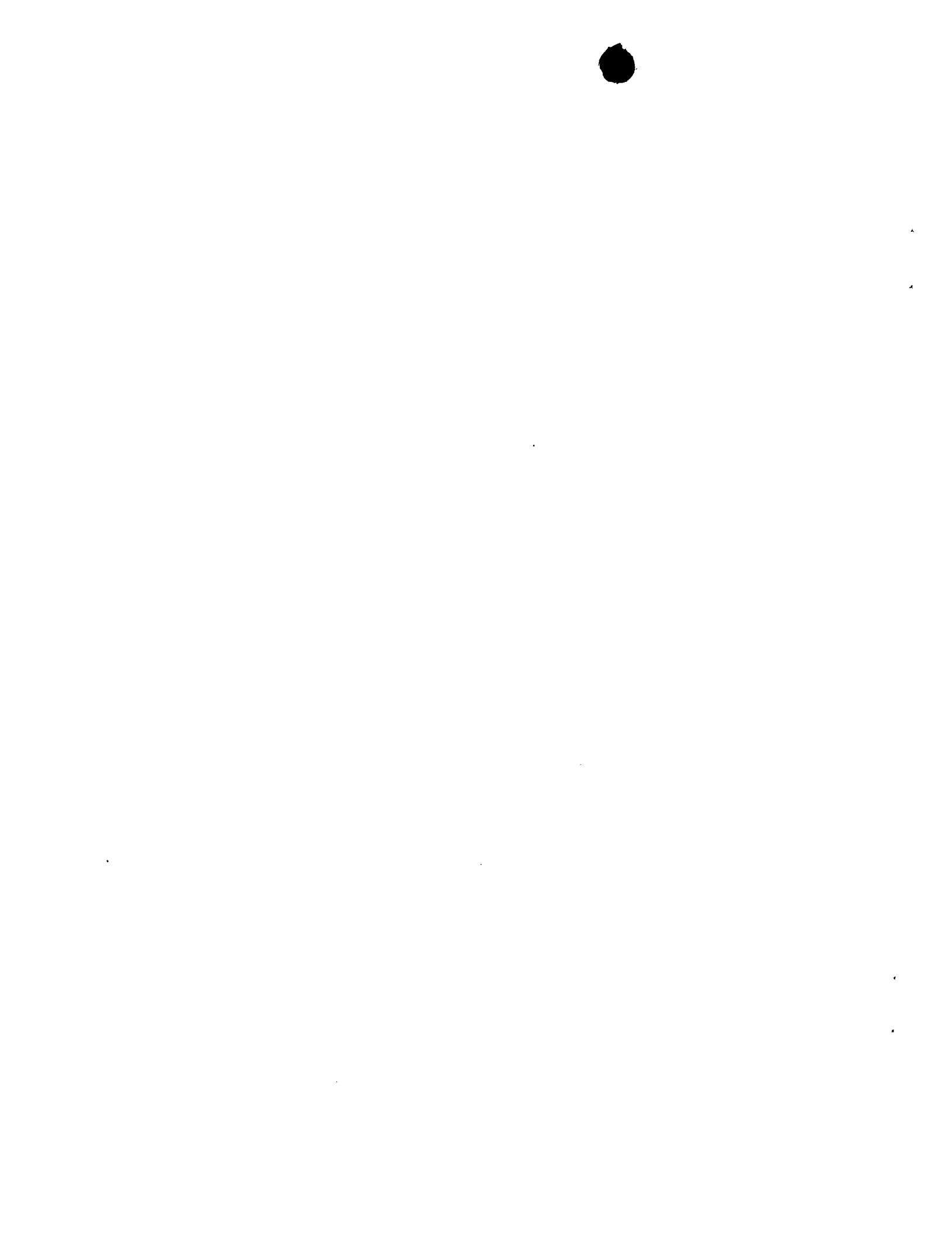


Fig. 2A  
ERSATZBLATT (REGEL 26)



3/9

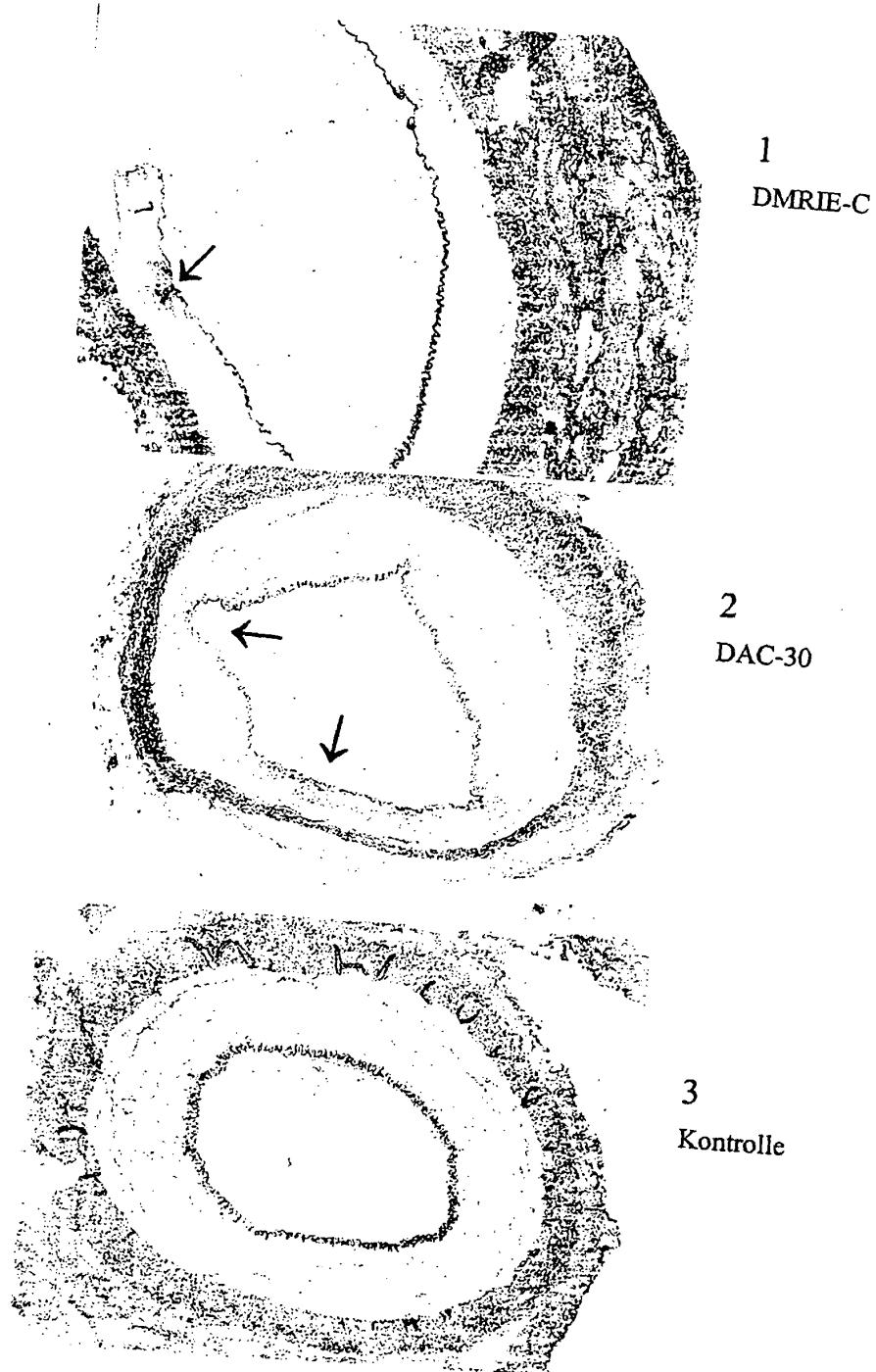
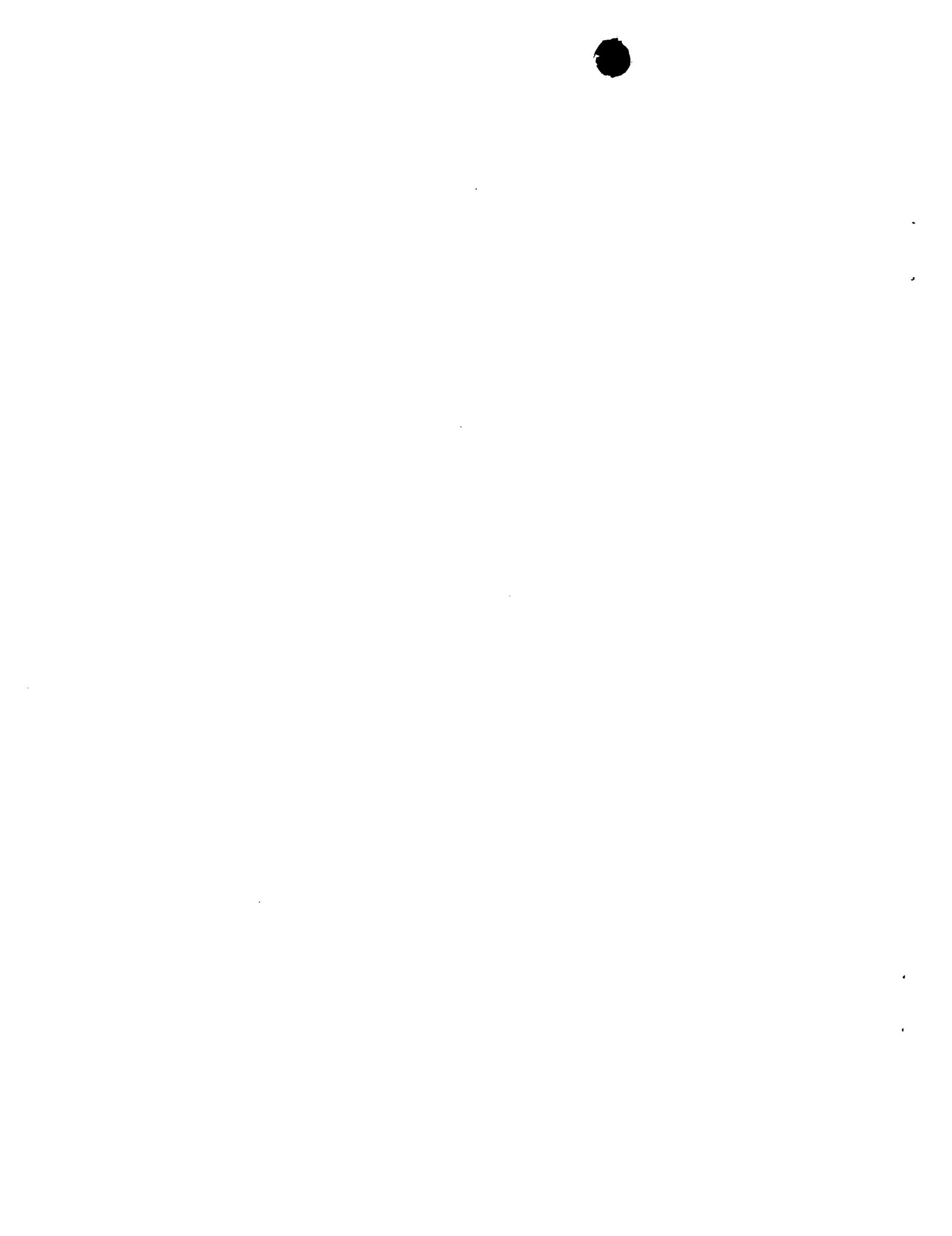


Fig. 2B  
ERSATZBLATT (REGEL 26)



4/9

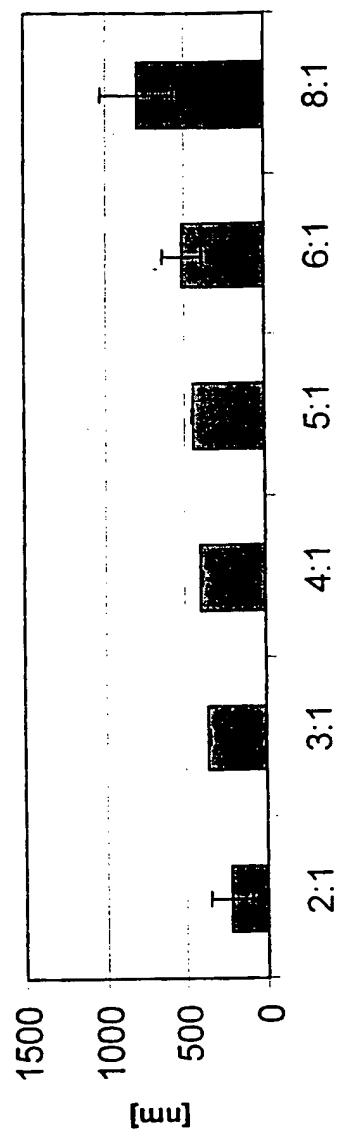
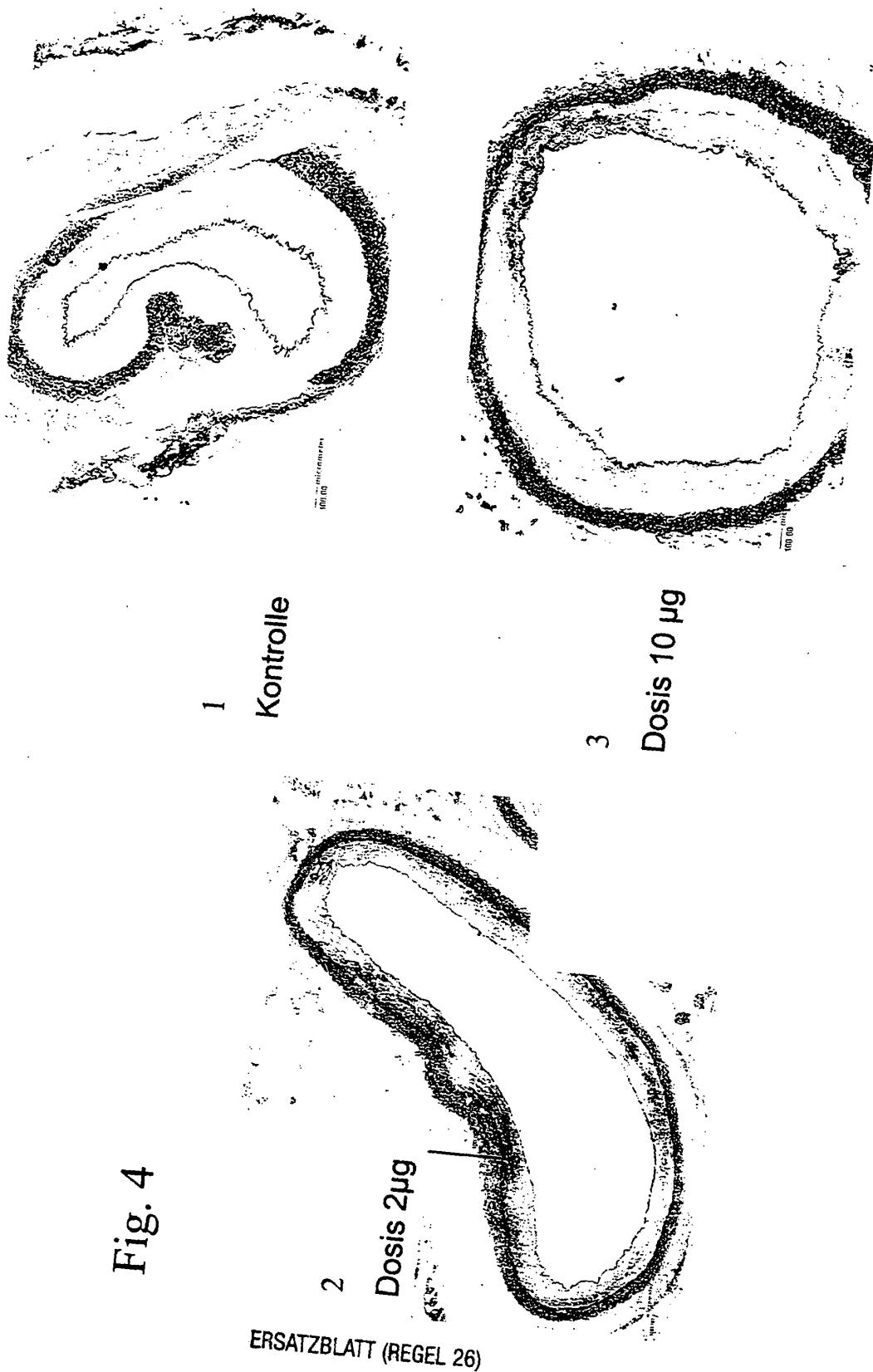
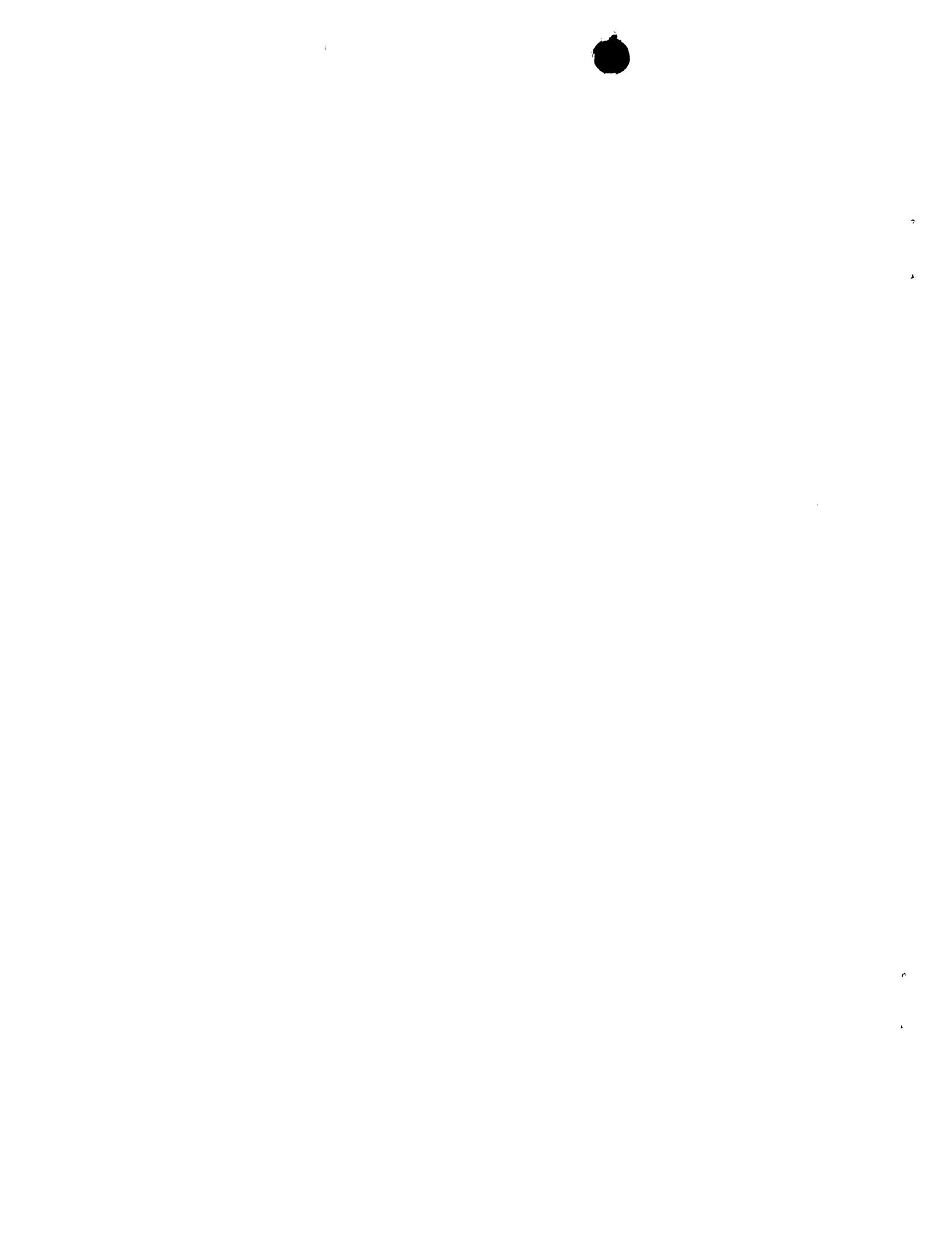


Fig. 3

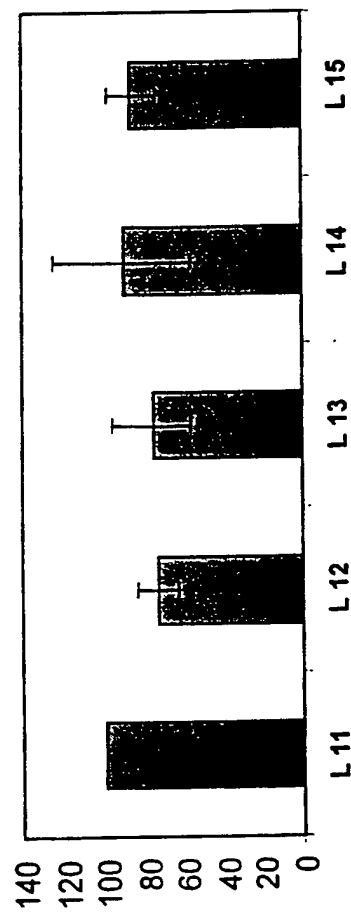


5/9





6/9



NOS-Expression  
[% Expression in L 11]

Fig. 5



7/9

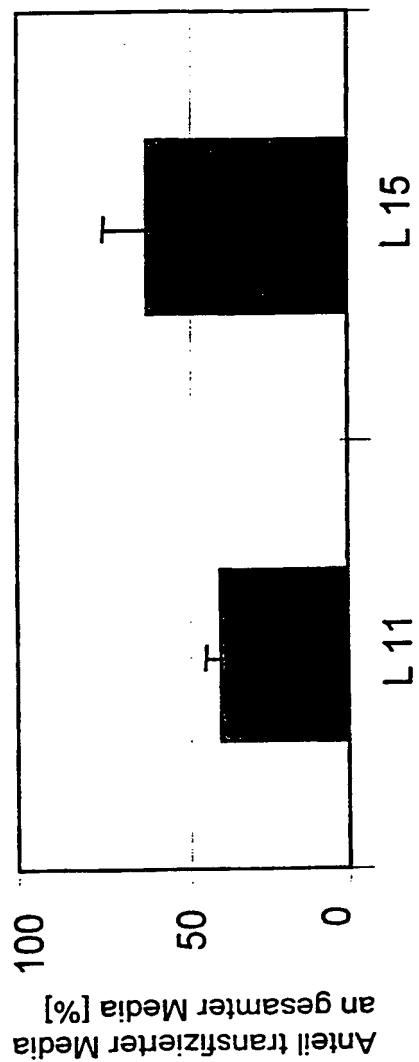
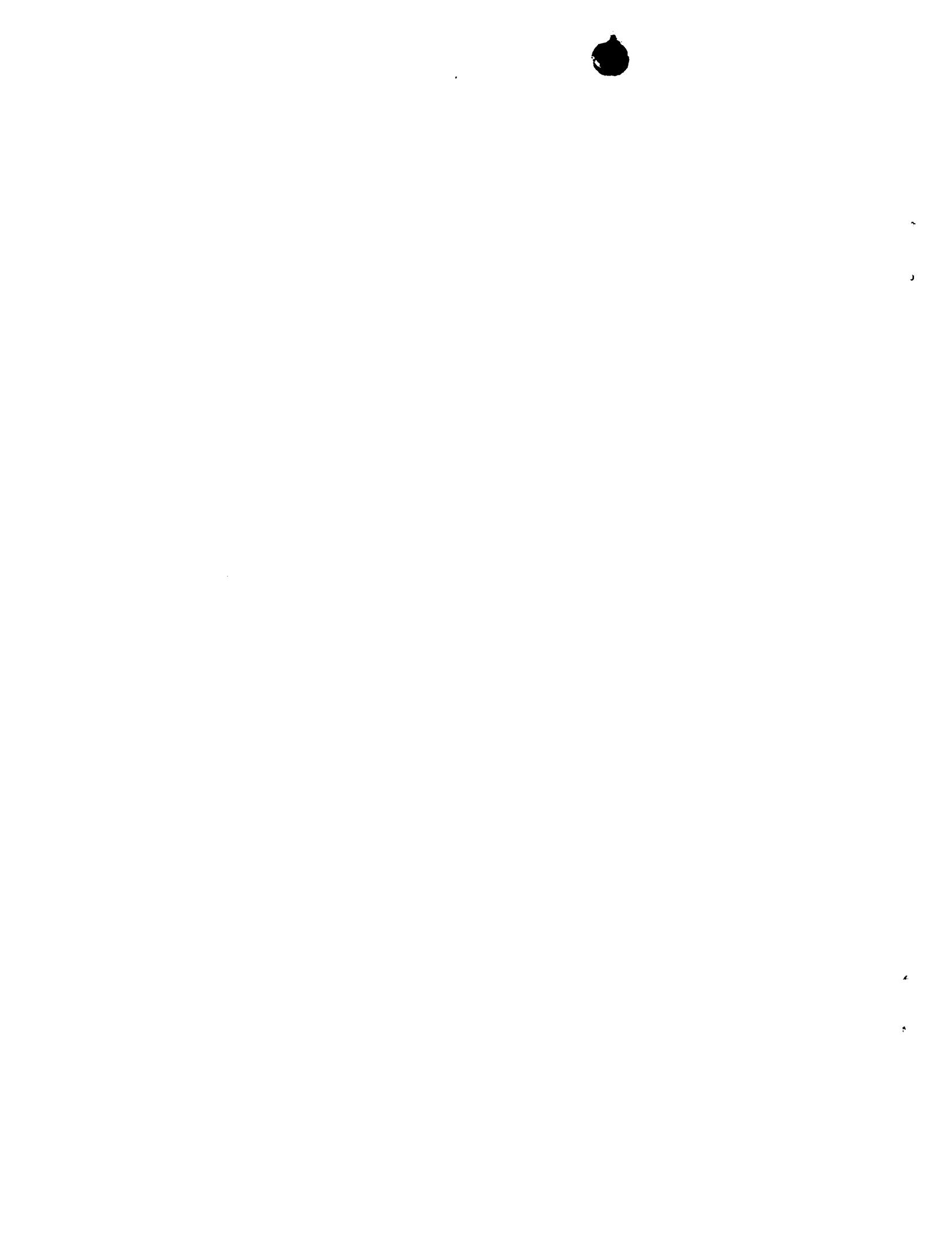


Fig. 6



8/9

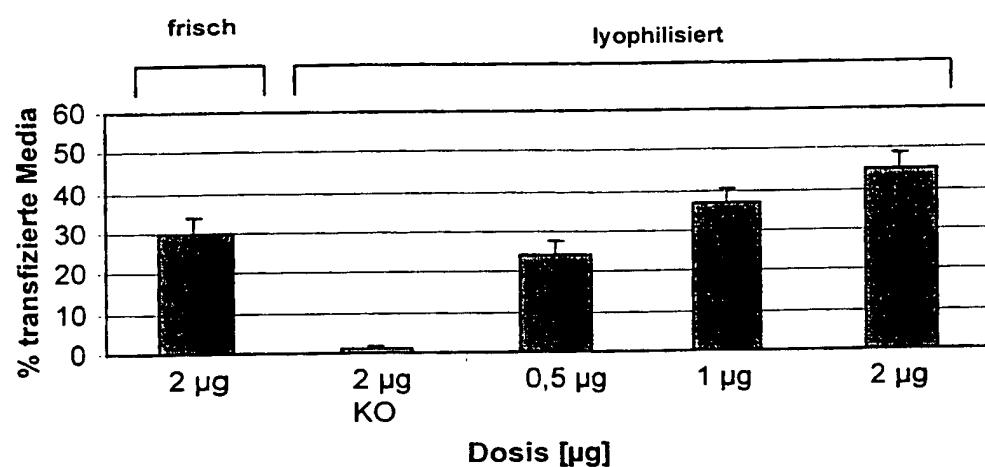
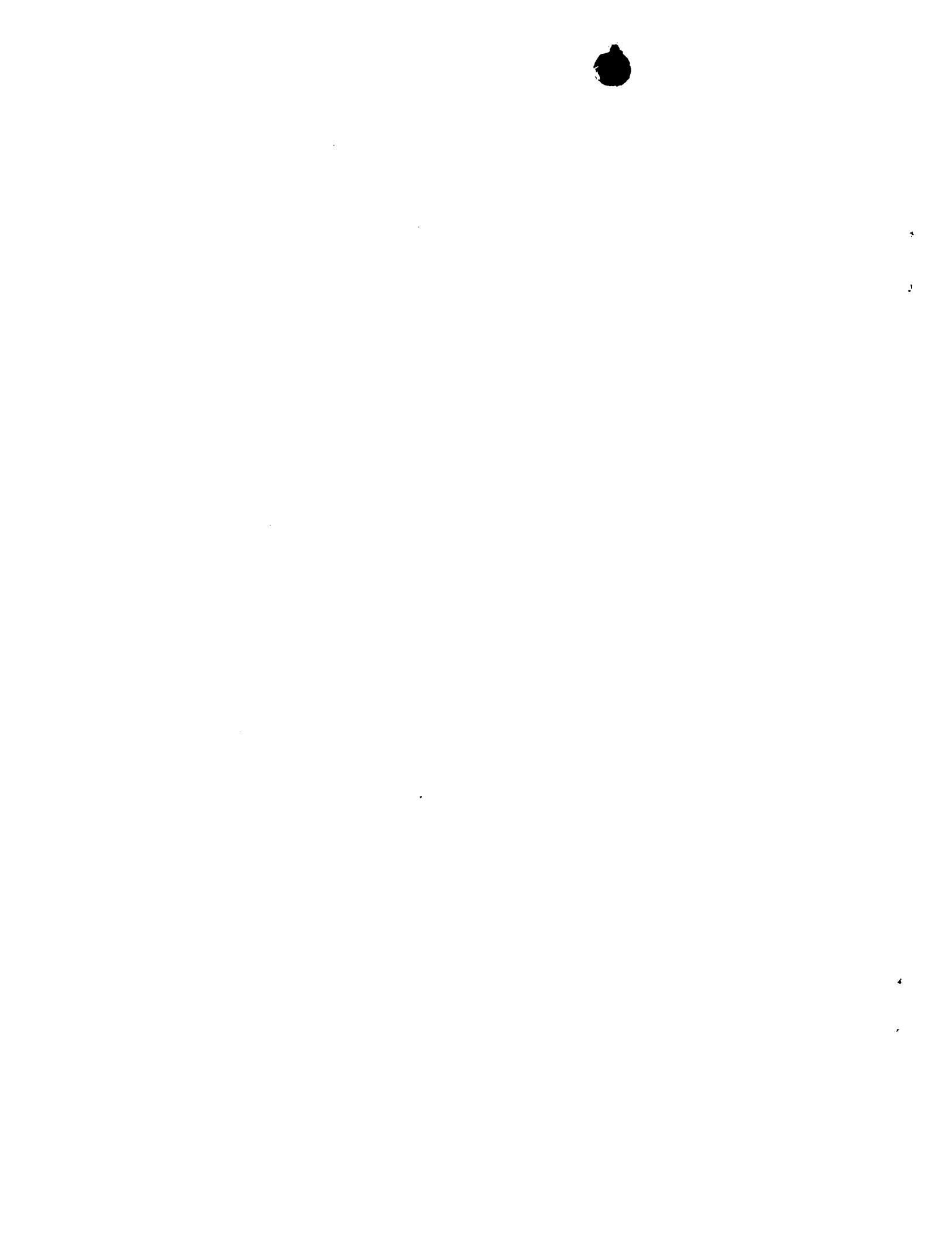


Fig. 7



9/9

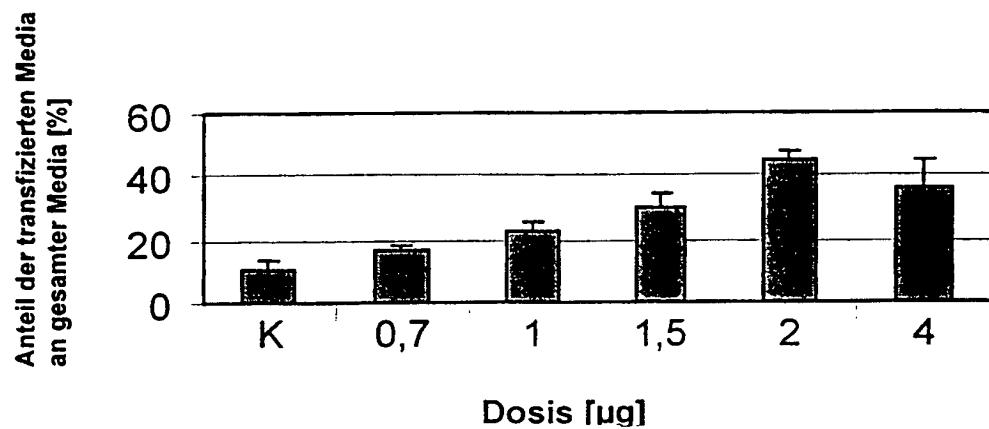


Fig. 8A

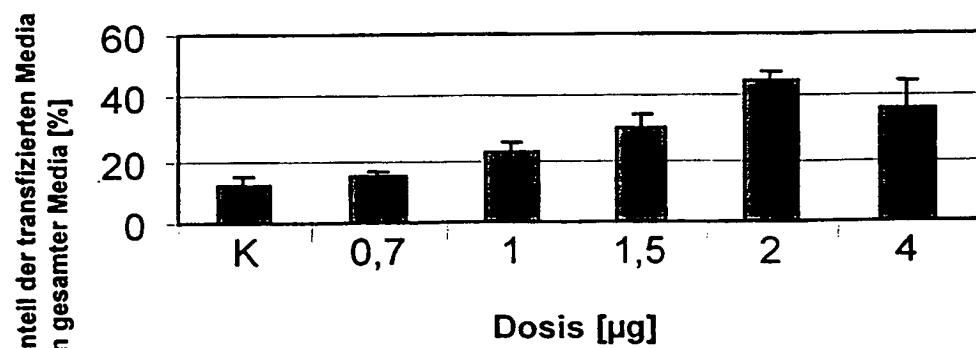


Fig. 8B



(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
22. März 2001 (22.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/19400 A3**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **A61K 9/127.** (74) Anwalt: BÖSL, Raphael; Bardehle, Pagenberg, Dost, Altenburg, Geissler, Isenbruck, Galileiplatz 1, 81679 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/08996

(81) Bestimmungsstaaten (national): AU, CA, CN, CZ, HU, ID, IL, IN, JP, KR, NO, PL, RU, SG, SI, SK, TR, US, ZA.

(22) Internationales Anmeldedatum:  
14. September 2000 (14.09.2000)

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(30) Angaben zur Priorität:  
199 44 262.2 15. September 1999 (15.09.1999) DE

Veröffentlicht:  
— mit internationalem Recherchenbericht

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **CARDIOGENE GENTHERAPEUTISCHE SYSTEME AG** [DE/DE]; Max-Planck-Strasse 15a, 40699 Erkrath (DE).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 14. Februar 2002

(72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **SCHLETTNER, Jens** [DE/DE]; Lortzingstrasse 27, 40742 Hilden (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

---

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION IN THE FORM OF A NUCLEIC ACID LIPID COMPLEX, THE PRODUCTION THEREOF AND ITS USE IN GENE THERAPY

(54) Bezeichnung: PHARMAZETISCHE ZUSAMMENSETZUNG IN FORM EINES NUKLEINSÄURE-LIPID-KOMPLEXES, IHRE HERSTELLUNG UND VERWENDUNG IN DER GENTHERAPIE

(57) Abstract: The invention relates to a pharmaceutical composition in the form of a nucleic acid lipid complex containing at least one cationic lipid, at least one non-cationic lipid, at least one nucleic acid that codes for a protein used for treating vascular diseases, especially a protein having vasodilatory and/or angiogenic properties, and optionally containing appropriate auxiliary and/or addition agents. According to the invention, the cationic lipid (KL) contains a group derived from cholesterol on which at least one cationic amino group selected from a primary, secondary, tertiary amino group and/or from a quaternary ammonium salt is bound via a connecting group selected from carboxamides and carbamoyls, and via a spacer comprised of a linear or branched alkyl group with 1 to 20 carbon atoms. In addition, the size of the nucleic acid lipid complexes ranges from approximately 300 to 800 nm. The invention also relates to the production of the pharmaceutical composition and to its use in gene therapy.

WO 01/19400 A3

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine pharmazeutische Zusammensetzung in Form eines Nukleinsäure-Lipid-Komplexes enthaltend mindestens ein kationisches Lipid, mindestens ein nicht-kationisches Lipid, mindestens eine Nukleinsäure kodierend für ein Protein zur Behandlung von Gefäßkrankheiten, insbesondere ein Protein mit gefäßweiternden und/oder gefäßbildenden Eigenschaften, und gegebenenfalls geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe, wobei das kationische Lipid (KL) eine von Cholesterin abgeleitete Gruppe enthält, an der über eine Verbindungsgruppe, ausgewählt aus Carboxamiden und Carbamoylen, und einen Spacer, bestehend aus einer linearen oder verzweigten Alkylgruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen, mindestens eine kationische Aminogruppe, ausgewählt aus primärer, sekundärer, tertiärer Aminogruppe und/oder einem quartären Ammoniumsalz, gebunden ist, und wobei die Größe der Nukleinsäure-Lipid-Komplexe in einem Bereich von ca. 300-800 nm liegt. Weiterhin betrifft die Erfindung die Herstellung der pharmazeutischen Zusammensetzung und ihre Verwendung in der Gentherapie.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No  
PCT/EP 00/08996

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 A61K9/127 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NABEL, ELIZABETH G. ET AL: "Methods for liposome-mediated gene transfer to the arterial wall" GENE THER. PROTOC. (1997), 127-133. EDITOR(S): ROBBINS, PAUL D. PUBLISHER: HUMANA, TOTOWA, N. J., XP000992423 page 127 -page 131 ---	1,2,5-7, 9,10,13, 14,17-19
X	US 5 658 565 A (NUESSLER ANDREAS K ET AL) 19 August 1997 (1997-08-19) column 20, line 8 - line 27 ---	1-7,13, 14,17-22
A	EP 0 891 780 A (CARDIOGENE GENTHERAPEUTISCHE S ;SCHRADER JUERGEN PROF DR (DE)) 20 January 1999 (1999-01-20) the whole document ---	1 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

13 July 2001

26.07.01

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Boulois, D

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 00/08996

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96 20208 A (MAX DELBRUECK CENTRUM ;RESZKA REGINA (DE)) 4 July 1996 (1996-07-04) cited in the application the whole document ---	1
A	WO 98 44934 A (SON KYONGHEE ;UNIV RUTGERS (US)) 15 October 1998 (1998-10-15) the whole document ---	1
A	WO 96 24333 A (CALIFORNIA INST OF TECHN) 15 August 1996 (1996-08-15) the whole document ---	1
A	GAO X ET AL: "A NOVEL CATIONIC LIPOSOME REAGENT FOR EFFICIENT TRANSFECTION OF MAMMALIAN CELLS" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS,US,ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, vol. 179, no. 1, 30 August 1991 (1991-08-30), pages 280-285, XP000572654 ISSN: 0006-291X the whole document ---	1
X	WO 96 40265 A (UNIV CALIFORNIA) 19 December 1996 (1996-12-19) claims 1-3 ---	26,27
X	ANCHORDOQUY, THOMAS J. ET AL: "Maintenance of transfection rates and physical characterization of lipid/ DNA complexes after freeze-drying and rehydration" ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS. (1997), 348(1), 199-206, XP000992258 the whole document ---	26,27
X	WO 96 27393 A (UNIV PITTSBURGH) 12 September 1996 (1996-09-12) page 11, line 15 -page 14, line 22 ---	26,27
X	WO 96 40964 A (INEX PHARMACEUTICALS CORP ;WHEELER JEFFERY J (CA); BALLY MARCEL B) 19 December 1996 (1996-12-19) page 63 -page 64; example 16 page 66 -page 67; example 21 ---	25,27
X	WO 96 34109 A (VICAL INC) 31 October 1996 (1996-10-31) page 19; example 11 ---	25,27
		-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

. Application No  
PCT/EP 00/08996

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 40067 A (ARONEX PHARMACEUTICALS INC) 19 December 1996 (1996-12-19) page 22 -page 24; examples 6,7 ---	25,27
X	WO 96 18372 A (GENZYME CORP) 20 June 1996 (1996-06-20) page 48, line 14 - line 18 -----	25,27

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No

PCT/EP 00/08996

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.



No protest accompanied the payment of additional search fees.

## Additional matter PCT/ISA/210

The International Searching Authority has found that this international application contains multiple inventions, as follows:

## 1. Claims Nos. 1-24

Pharmaceutical composition provided in the form of a nucleic acid lipid complex.

## 2. Claims Nos. 25-27

Use of an iso-osmotic composition comprising at least one monosaccharide and/or disaccharide, and/or at least one polyhydric alcohol and/or at least one inorganic salt for stabilizing nucleic acid lipid complexes.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/08996

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5658565	A 19-08-1997	AU 716623 B AU 2869095 A CA 2193827 A EP 0769903 A JP 10501989 T WO 9600006 A US 6103230 A US 5830461 A ZA 9505210 A		02-03-2000 19-01-1996 04-01-1996 02-05-1997 24-02-1998 04-01-1996 15-08-2000 03-11-1998 21-02-1996
EP 0891780	A 20-01-1999	DE 19729769 A DE 29724326 U JP 11080033 A US 6200304 B		14-01-1999 07-12-2000 23-03-1999 13-03-2001
WO 9620208	A 04-07-1996	DE 4446937 A AT 186546 T DE 19623916 A DE 59507224 D EP 0748332 A US 5888821 A		04-07-1996 15-11-1999 11-12-1997 16-12-1999 18-12-1996 30-03-1999
WO 9844934	A 15-10-1998	AU 6957198 A		30-10-1998
WO 9624333	A 15-08-1996	US 5660855 A AU 5022096 A		26-08-1997 27-08-1996
WO 9640265	A 19-12-1996	AU 720187 B AU 2117999 A AU 707734 B AU 5938196 A CA 2223921 A EP 0833667 A US 5811406 A		25-05-2000 13-05-1999 15-07-1999 30-12-1996 19-12-1996 08-04-1998 22-09-1998
WO 9627393	A 12-09-1996	AU 5417796 A		23-09-1996
WO 9640964	A 19-12-1996	US 5705385 A US 5981501 A AU 723163 B AU 6330796 A CA 2222328 A EP 0832271 A JP 11507537 T US 5976567 A		06-01-1998 09-11-1999 17-08-2000 30-12-1996 19-12-1996 01-04-1998 06-07-1999 02-11-1999
WO 9634109	A 31-10-1996	CA 2214029 A EP 0826063 A JP 11504631 T		31-10-1996 04-03-1998 27-04-1999
WO 9640067	A 19-12-1996	US 5753262 A		19-05-1998
WO 9618372	A 20-06-1996	US 5650096 A US 5747471 A US 6071890 A AU 716706 B AU 4516196 A CA 2205968 A		22-07-1997 05-05-1998 06-06-2000 02-03-2000 03-07-1996 20-06-1996

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/EP 00/08996

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9618372 A		EP 0799059 A	08-10-1997
		JP 10510813 T	20-10-1998
		US 5767099 A	16-06-1998
		US 5840710 A	24-11-1998
		US 5719131 A	17-02-1998
		US 5910487 A	08-06-1999
		US 5783565 A	21-07-1998
		US 5948767 A	07-09-1999
		US 5939401 A	17-08-1999



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Rech. Aktenzeichen  
PCT/EP 00/08996

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 A61K9/127 A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	NABEL, ELIZABETH G. ET AL: "Methods for liposome-mediated gene transfer to the arterial wall" GENE THER. PROTOC. (1997), 127-133. EDITOR(S): ROBBINS, PAUL D. PUBLISHER: HUMANA, TOTOWA, N. J., XP000992423 Seite 127 -Seite 131 ---	1,2,5-7, 9,10,13, 14,17-19
X	US 5 658 565 A (NUESSLER ANDREAS K ET AL) 19. August 1997 (1997-08-19) Spalte 20, Zeile 8 - Zeile 27 ---	1-7,13, 14,17-22
A	EP 0 891 780 A (CARDIOGENE GENTHERAPEUTISCHE S ;SCHRADER JUERGEN PROF DR (DE)) 20. Januar 1999 (1999-01-20) das ganze Dokument ---	1 -/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- ° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- \*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- \*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- \*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- \*&\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

13. Juli 2001

26.07.01

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter  
  
Boulois, D

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Ir. **ationales Aktenzeichen**  
**PCT/EP 00/08996**

**C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 96 20208 A (MAX DELBRUECK CENTRUM ;RESZKA REGINA (DE)) 4. Juli 1996 (1996-07-04) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1
A	WO 98 44934 A (SON KYONGHEE ;UNIV RUTGERS (US)) 15. Oktober 1998 (1998-10-15) das ganze Dokument ---	1
A	WO 96 24333 A (CALIFORNIA INST OF TECHN) 15. August 1996 (1996-08-15) das ganze Dokument ---	1
A	GAO X ET AL: "A NOVEL CATIONIC LIPOSOME REAGENT FOR EFFICIENT TRANSFECTION OF MAMMALIAN CELLS" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS,US,ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, Bd. 179, Nr. 1, 30. August 1991 (1991-08-30), Seiten 280-285, XP000572654 ISSN: 0006-291X das ganze Dokument ---	1
X	WO 96 40265 A (UNIV CALIFORNIA) 19. Dezember 1996 (1996-12-19) Ansprüche 1-3 ---	26,27
X	ANCHORDOQUY, THOMAS J. ET AL: "Maintenance of transfection rates and physical characterization of lipid/ DNA complexes after freeze-drying and rehydration" ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS. (1997), 348(1), 199-206, XP000992258 das ganze Dokument ---	26,27
X	WO 96 27393 A (UNIV PITTSBURGH) 12. September 1996 (1996-09-12) Seite 11, Zeile 15 -Seite 14, Zeile 22 ---	26,27
X	WO 96 40964 A (INEX PHARMACEUTICALS CORP ;WHEELER JEFFERY J (CA); BALLY MARCEL B) 19. Dezember 1996 (1996-12-19) Seite 63 -Seite 64; Beispiel 16 Seite 66 -Seite 67; Beispiel 21 ---	25,27
X	WO 96 34109 A (VICAL INC) 31. Oktober 1996 (1996-10-31) Seite 19; Beispiel 11 ---	25,27
	-/-	

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

nales Aktenzeichen  
PCT/EP 00/08996

**C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie <sup>a</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beir. Anspruch Nr.
X	WO 96 40067 A (ARONEX PHARMACEUTICALS INC) 19. Dezember 1996 (1996-12-19) Seite 22 -Seite 24; Beispiele 6,7 ---	25,27
X	WO 96 18372 A (GENZYME CORP) 20. Juni 1996 (1996-06-20) Seite 48, Zeile 14 - Zeile 18 -----	25,27

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 00/08996

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1.  Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
  
2.  Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
  
3.  Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
  
2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
  
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
  
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
<p>Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:</p> <p>1. Ansprüche: 1-24</p> <p>Pharmazeutische Zusammensetzung in Form eines Nukleinsäure-Lipid Komplexes</p> <p>2. Ansprüche: 25-27</p> <p>Verwendung einer isoosmotische Zusammensetzungen umfassend mindestens ein Mono- und/oder Disaccharid, und/oder mindestens einen mehrwertigen Alkohol und/oder mindestens ein anorganisches Salz zur Stabilisierung von Nukleinsäure-Lipid-Komplexen</p>	

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffent

n. die zur selben Patentfamilie gehören

internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/08996

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5658565 A	19-08-1997	AU 716623 B AU 2869095 A CA 2193827 A EP 0769903 A JP 10501989 T WO 9600006 A US 6103230 A US 5830461 A ZA 9505210 A		02-03-2000 19-01-1996 04-01-1996 02-05-1997 24-02-1998 04-01-1996 15-08-2000 03-11-1998 21-02-1996
EP 0891780 A	20-01-1999	DE 19729769 A DE 29724326 U JP 11080033 A US 6200304 B		14-01-1999 07-12-2000 23-03-1999 13-03-2001
WO 9620208 A	04-07-1996	DE 4446937 A AT 186546 T DE 19623916 A DE 59507224 D EP 0748332 A US 5888821 A		04-07-1996 15-11-1999 11-12-1997 16-12-1999 18-12-1996 30-03-1999
WO 9844934 A	15-10-1998	AU 6957198 A		30-10-1998
WO 9624333 A	15-08-1996	US 5660855 A AU 5022096 A		26-08-1997 27-08-1996
WO 9640265 A	19-12-1996	AU 720187 B AU 2117999 A AU 707734 B AU 5938196 A CA 2223921 A EP 0833667 A US 5811406 A		25-05-2000 13-05-1999 15-07-1999 30-12-1996 19-12-1996 08-04-1998 22-09-1998
WO 9627393 A	12-09-1996	AU 5417796 A		23-09-1996
WO 9640964 A	19-12-1996	US 5705385 A US 5981501 A AU 723163 B AU 6330796 A CA 2222328 A EP 0832271 A JP 11507537 T US 5976567 A		06-01-1998 09-11-1999 17-08-2000 30-12-1996 19-12-1996 01-04-1998 06-07-1999 02-11-1999
WO 9634109 A	31-10-1996	CA 2214029 A EP 0826063 A JP 11504631 T		31-10-1996 04-03-1998 27-04-1999
WO 9640067 A	19-12-1996	US 5753262 A		19-05-1998
WO 9618372 A	20-06-1996	US 5650096 A US 5747471 A US 6071890 A AU 716706 B AU 4516196 A CA 2205968 A		22-07-1997 05-05-1998 06-06-2000 02-03-2000 03-07-1996 20-06-1996

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur gleichen Patentfamilie gehören

... als Aktenzeichen

PCT/EP 00/08996

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9618372 A		EP 0799059 A	08-10-1997
		JP 10510813 T	20-10-1998
		US 5767099 A	16-06-1998
		US 5840710 A	24-11-1998
		US 5719131 A	17-02-1998
		US 5910487 A	08-06-1999
		US 5783565 A	21-07-1998
		US 5948767 A	07-09-1999
		US 5939401 A	17-08-1999

